

**Aus der der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Klaus Fries

Expression von Inhibin und Aktivin in Ovarialkarzinomen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefan Wagner
aus Amberg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. habil. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Walter Hofmann

Prof. Dr. Gerlinde Debus

Priv. Doz. Dr. Marion Subklewe

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. habil. Ioannis Mylonas

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2009

Meiner Familie

1 Einleitung	- 7 -
1.1 Anatomie, Histologie und Tumoren des Ovars	- 7 -
1.1.1 Das Ovarium	- 7 -
1.1.2 Ovarielle Tumoren	- 7 -
1.1.3 Risikofaktoren	- 11 -
1.1.4 Histopathologische Klassifikation und Stadieneinteilung	- 12 -
1.2 Inhibin und Aktivin	- 14 -
1.2.1 Inhibin	- 15 -
1.2.1.1 Struktur und Sekretionsloci	- 16 -
1.2.1.2 Weiblicher Zyklus und Inhibinproduktion	- 18 -
1.2.1.3 Inhibin und Neoplasien	- 18 -
1.2.2 Aktivin	- 20 -
1.2.2.1 Signalweg und Rezeptoren	- 20 -
1.3 Zielsetzung der Arbeit	- 21 -
2 Material und Methoden	- 22 -
2.1 Patientinnenkollektiv	- 22 -
2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA/EIA)	- 22 -
2.2.1 Der Inhibin-ELISA	- 23 -
2.2.1.1 Inhibin A ELISA DSL-10-18200i (Lot-Nr. 891270)	- 24 -
2.2.1.2 Inhibin B ELISA DSL-10-84100i (Lot-Nr. 891466)	- 26 -
2.2.2 Der Aktivin-ELISA	- 28 -
2.3 Verarbeitung der Gewebeproben	- 30 -
2.3.1 Einbettung in Paraffin	- 30 -
2.3.2 Immunhistochemische Aufarbeitung	- 30 -
2.3.3 Kontrollen	- 33 -
2.3.4 Auswertung	- 33 -
2.4 Verwendete Materialien	- 36 -
2.5 Statistische Analyse	- 39 -
3 Ergebnisse	- 40 -
3.1 Serumanalyse	- 42 -

3.1.1	Vergleich der Serumkonzentration von Inhibin A im Serum von Patientinnen mit malignen, mit dem der Patientinnen mit benignen Erkrankungen.....	- 42 -
3.1.2	Vergleich der Serumkonzentration der Aktivine im Serum von Patientinnen mit malignen, mit dem der Patientinnen mit benignen Erkrankungen.....	- 43 -
3.1.3	Vergleich der Serumkonzentration des Inhibin A im Serum von Patientinnen innerhalb der malignen Erkrankungen.....	- 44 -
3.1.4	Vergleich der Serumkonzentration der Aktivine im Serum von Patientinnen innerhalb der malignen Erkrankungen.....	- 45 -
3.1.5	Vergleich der Serumkonzentration des Inhibin A im Serum von Patientinnen innerhalb der benignen Erkrankungen.....	- 46 -
3.1.6	Vergleich der Serumkonzentration der Aktivine im Serum von Patientinnen innerhalb der benignen Erkrankungen.....	- 47 -
3.2	Immunhistochemische Analyse	- 48 -
3.2.1	Vergleich der Expression der Inhibin- α -Untereinheit im Gewebe von Patientinnen mit malignen und dem von Patientinnen mit benignen Erkrankungen ..	- 48 -
3.2.2	Vergleich der Expression der Inhibin- β -Untereinheiten im Gewebe von Patientinnen mit malignen und dem von Patientinnen mit benignen Erkrankungen ..	- 50 -
3.2.3	Vergleich der Expression der Inhibin- α -Untereinheit im Gewebe von Patientinnen mit malignen Erkrankungen	- 53 -
3.2.4	Vergleich der Expression der Inhibin β B- und β E-Untereinheiten im Gewebe von Patientinnen mit malignen Erkrankungen	- 54 -
3.2.5	Vergleich der Expression der Inhibin- α -Untereinheit im Gewebe von Patientinnen mit benignen Erkrankungen.....	- 55 -
3.2.6	Vergleich der Expression von Inhibin β B- und β E-Untereinheiten im Gewebe von Patientinnen innerhalb der benignen Erkrankungen.....	- 56 -
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	- 57 -
4	Diskussion	- 58 -
4.1	Auswahl der Patienten.....	- 58 -
4.2	Inhibin-/Aktivinuntereinheiten als Marker zur Differenzierung in Serum und Gewebe mit Malignität.....	- 58 -

4.3	Zusammenhang der Inhibinuntereinheiten in Serum und Gewebe innerhalb Malignität.....	- 60 -
4.4	Zusammenhang der Inhibinuntereinheiten in Serum und Gewebe mit Benignität.....	62 -
5	Zusammenfassung.....	- 65 -
6	Literaturnachweis.....	- 67 -
7	Anhang.....	- 78 -
7.1	Abkürzungen	- 78 -
7.2	Danksagung	- 80 -
7.3	Lebenslauf.....	- 81 -

1 Einleitung

1.1 Anatomie, Histologie und Tumoren des Ovars

1.1.1 Das Ovarium

Die weibliche Keimdrüse, das Ovarium (lat. Ovum = Ei), liegt am Ende der Tuba uterina und hat bei einer geschlechtsreifen Frau mit einer Größe von ca. 3,0-5,0 x 1,5-3,0 x 0,6-1,5 cm sehr variable Ausmaße. Postmenopausal kann es sogar bis auf Mandelgröße zusammenschrumpfen. Tube und Eierstock ergeben zusammen das Adnexium. Das Ovar ist zwischen dem Lig. Ovarii proprium und dem Lig. Suspensorium ovarii aufgehängt. Seine Vorderfläche ist über das Mesovar und den Hilus ovarii mit dem Lig. Latum uteri verbunden, mit der Hinterfläche weist es ins kleine Becken. Der Facies medialis können Intestinum oder Kolon anliegen. Am Boden der Fossa ovarica grenzt die Facies lateralis an die A. und V. obturatoria und den N. obturatorius.

Die mikroskopische Gliederung des Ovars erfolgt in vier Schichten. Die äußerste ist der Peritonealüberzug/Keimepithel mit ausgeprägter Basalmembran. Es folgt die Tunica albuginea, eine weißliche, bindegewebige Kapsel, welche sich ins Stroma ovarii fortsetzt. Die nächste Schicht ist der Cortex ovarii, die Eierstockrinde mit den Ovarialfollikeln. Zentral befindet sich die Medulla ovarii, das Eierstockmark, ein lockeres Bindegewebe mit darin enthaltenen Blut- und Lymphgefäßen sowie den Nerven. Die Hauptfunktionen sind einerseits eine generative, also die Oogenese im Keimepithel. Es folgen Follikelreifung, Ovulation und Bildung des Corpus luteum. Andererseits kommt dem Ovar auch eine vegetative, endokrine Bedeutung zu. In den Stromazellen werden u.a. Östrogene, Gestagene und in geringen Mengen Androstendion produziert, welche über Zwischenstufen aus Cholesterin gewonnen werden [47].

1.1.2 Ovarielle Tumoren

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 9.950 Frauen an Ovarialkarzinomen. Mit 4,8% ist dies die fünfthäufigste aller bösartigen Neubildungen bei Frauen und liegt, mit einem Lebenszeitrisiko von 1,0-1,4%, zwischen der des Korpus- und Zervixkarzinoms. Durch die schlechtere Prognose aufgrund mangelnder Früherkennungsmethoden und spät einsetzender, relativ unspezifischer

Symptomatik, liegt hier die Sterblichkeit allerdings höher, als im Vergleich zum Endometrium- und Zervixkarzinom zusammengefasst. Die altersspezifische Inzidenz entspricht in etwa der des Corpuskarzinoms. Bemerkenswerterweise kommt es bereits unter 45 Jahren zu einem Auftreten von etwa 10% aller Ovarialkarzinome, in überwiegender Zahl Keimzelltumore. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren [27].

Deutschland befindet sich was die Inzidenz betrifft, im EU-Vergleich in den vorderen Rängen. Hohe Inzidenzraten findet man u.a. in Litauen, Tschechien, Estland, Dänemark und Lettland. Die niedrigsten in Südeuropa (Italien, Portugal und Griechenland) [27]. Für eine allgemeine Gesamtklassifikation von Ovarialtumoren nach WHO sei auf das Werk von Scully et al. verwiesen, welche eine Typisierung von Ovarialkarzinomen nach internationalen histologischen Richtlinien erlaubt [76].

Im Folgenden werden die unterschiedenen Malignome des Ovars zusammengefasst.

Oberflächenepithel-Stromatumoren (bis 90%)

Diese Tumorart wird anhand des Zelltyps (serös, muzinös, endometrioid, klarzellig, Übergangszelltyp oder gemischte Zelltypen) [75,76], nach der überwiegenden Wachstumsrichtung (oberflächlich-papillär oder zystisch) und dem fibrösen Stromaanteil klassifiziert. Klinisch relevanter ist allerdings die Einteilung nach deren Malignität: benigne, eindeutig maligne und Borderline-Tumoren. Die letztgenannten besitzen zwar einige, jedoch nicht alle Malignitätskriterien (invasives, destruktives Wachstum; unreife, heterologe, schlecht differenzierte Gewebe; polymorphe, polychromatische und polyploide Kerne, unregelmäßiges Chromatin, viele atypische Mitosen; Metastasen; häufig Rezidive) [15]. Selbige sind überwiegend aufs Ovar begrenzt und zeichnen sich auch in ausgedehnten Stadien durch eine sehr gute Prognose aus [16].

In 20-30% der Fälle sind die serösen Tumoren invasive Karzinome, 10-15% Borderline-Tumoren und ca. 60% sind benigne. Sie unterscheiden sich auch hinsichtlich ihres hauptsächlichen Auftretens in unterschiedlichen Altersgruppen. Die Karzinome treten in 35% doppelseitig auf [61] und dehnen sich früh über das gesamte Abdomen aus, metastasieren diffus, aber besonders in Lymphknoten und in den pleuropulmonalen Raum. Im Jahre 1994 befanden sich, laut einer Studie von Petterson et al. in Schweden, 73,8% aller entdeckten serösen Ovarialkarzinome im Stadium III oder IV, lediglich 16,2% im Stadium I.

Demgegenüber findet man 49,2% aller invasiven muzinösen Karzinome auf ein Ovar begrenzt, also in Stadium I. Lediglich 42,3% befinden sich bei Diagnosestellung in Stadium III oder IV. Somit erklärt sich die mit 56% höchste 5-JÜR aller histologischen Subtypen.

Das endometrioides Karzinom bleibt mit 52% zwar häufiger als das seröse (26%), damit aber weniger häufig als das muzinöse (58%) auf das kleine Becken beschränkt [61]. Bei diesem Tumor handelt es sich um ein Adenokarzinom, welches in Struktur und Art des Stroma dem Endometriumkarzinom ähnelt. Etwa 10% aller Ovarial- und knapp 20% der endometrioiden Karzinome sind mit diesem assoziiert.

In Kombination mit einer Endometriose treten am häufigsten die Klarzelligen Karzinome auf [83]. Diese bilden einen Anteil von 5,1% an den Ovarialkarzinomen und stehen, hinsichtlich ihrer Benignität nach den muzinösen an zweiter Stelle unter den epithelialen Subtypen, da nur 35,6% in Stadium III und IV diagnostiziert werden und deren 5-JÜR immerhin noch 50% beträgt [36].

Das in jungen Jahren (9-35 LJ.) auftretende, kleinzellige Karzinom ist ein zwar seltener, jedoch hochmaligner Tumor. Auch die primären Übergangszell- und Plattenepithelkarzinome sind eine ausgesprochene Rarität. Ebenso die Adenosarkome und mesodermale Mischtumoren (Müllersche Mischtumoren), die beide schlechte Prognosen aufweisen [60].

Eine Sonderform bezüglich der Ausbreitung ist mit einem Anteil von 8% aller Ovarialkarzinome das Peritonealkarzinom. Dieses, auch als extraovarielles, papillär-serös bezeichnete Karzinom tritt zwar nur superfiziell an den Ovarien auf, dafür aber auch multifokal innerhalb des Peritonealraumes und ist nicht als Metastase zu verstehen, sondern als multipler Primärtumor. Ansonsten besteht jedoch kein Unterschied zu ausgedehnten Ovarialkarzinomen.

Keimstrangstromatumoren (bis 3%)

Diese Art von Tumor wird aus den Keimsträngen oder aus dem undifferenzierten Mesenchym des embryonalen Gonadengewebes gebildet und ist fakultativ hormonell aktiv. Die endokrine Eigenschaft lässt allerdings keine sichere Aussage über Malignität zu.

Das tumorbildende Gewebe differenziert sich bei Frauen eher zu Granulosa- oder Thekazelltumoren, häufiger im männlichen Körper zu Sertoli-Leydig-Zelltumoren. Es können aber auch Gynandroblastome, also Mischformen mit Bestandteilen von Stroma-, Theka-, Granulosa-, Sertoli-, und/oder Leydig-Zellen auftreten.

Die adulten (4.-7. Lebensdekade) Granulosazelltumoren können von den deutlich selteneren juvenilen (erste beiden Lebensdekaden) abgegrenzt werden. Adulte Formen machen 1-2% aller

Ovarialtumoren, 5% der malignen Formen und 95% aller Granulosazelltumoren aus. An dieser Tumorart wurde erstmals der hohe Nutzen einer Inhibin-Serum-Bestimmung festgestellt [17,25,70]. 90% der Neoplasien werden in Stadium I entdeckt, die Prognose entspricht der der epithelialen Formen. In der juvenilen Gruppe liegt diese Quote sogar noch etwas höher, die 5-JÜR beträgt im also häufigsten Stadium I über 90%.

Das Thekom, eine aus lipidreichen Zellen bestehende, gutartige, den Theca-interna-Zellen ähnliche Neoplasie ist der häufigste endokrin aktive Ovarialtumor. Seine hormonell inaktive Form ist das Fibrom.

Eine, mit 0,5% aller Ovarialtumoren, äußerst seltene Form ist das Androblastom. Dieser Sertoli-Leydigzelltumor tritt primär bei jüngeren Patientinnen auf, zu 80% im Stadium I. Deren Prognose ist primär von Ausbreitungsgrad und Differenzierung abhängig, sie tendiert jedoch nur in den Fällen mit weiter Ausbreitung in Richtung schlecht.

Keimzelltumoren

Etwa 1-3% der malignen und 20% aller Ovarialtumoren entfallen auf die Keimzelltumoren. Zwar haben 95% benignen Charakter, zumeist handelt es sich um zystisch-solide Teratome oder Dermoidzysten, es entwickeln sich jedoch über 2/3 der Ovarialtumoren bei unter 20-jährigen aus den Keimzellen. Davon sind nur 1/3 als maligne zu klassifizieren, insgesamt aber machen Keimzelltumoren wiederum 2/3 der malignen Ovarialkarzinome in dieser Altersklasse aus. Es werden undifferenzierte Formen, wie Dysgerminom und Seminom, mit Ursprung beim Trophoblasten, von Dottersacktumor und Chorionkarzinom, sowie embryoblastische wie Teratome und embryonales Karzinom unterschieden [76].

Das Dysgerminom tritt besonders in der Zeit von Kindes- bis frühem Erwachsenenalter auf und stellt mit 20-30% das häufigste Malignom des Ovars während der Gravidität dar, besitzt aber dennoch eine sehr gute Prognose.

Der mit ca. 20% zweithäufigste maligne Keimzelltumor ist der des Dottersacks, früher als Mesonephrom, heute ebenso als endodermaler Sinustumor bezeichnet. Auch bei diesem, innerhalb von Wochen wachsenden Tumor hat die überwiegende Mehrzahl der Patientinnen das 30. Lj. noch nicht überschritten. Da hochmaligne, fand selbst bei R1-Resektion (R0-Resektion: Entfernung des Tumors im Gesunden. In der Histopathologie kein Tumorgewebe im Resektionsrand nachweisbar. R1-Resektion: Makroskopisch wurde der Tumor entfernt. In der Histopathologie sind jedoch kleinere Tumoranteile im Resektionsrand nachweisbar. R2-

Resektion: Grössere, makroskopisch sichtbare Teile des Tumors konnten nicht reseziert werden.) die Metastasierung meistens schon statt, die Prognose ist also auch hier nicht als gut zu bewerten. Im Rahmen der Keimzelltumoren seien der Vollständigkeit halber, noch die sehr seltenen primären (nicht graviditätsbedingten und deshalb prognostisch schlechter einzustufenden) Chorionkarzinome, die seltenen Embryonalen Karzinome (am wenigsten Differenzierung von allen) und der seltenste, das Polyembryom (ebenfalls hoch maligne), erwähnt [61].

Ebenfalls in die Gruppe der Keimzelltumoren fallen die Teratome, welche definitionsgemäß aus drei Keimblättern bestehen und deren maligne Form sich mit 15% an dritter Stelle befindet. Deren Einteilung erfolgt in drei Subklassen: Unreife oder solide Teratome stellen 1% davon, sind maligne und prognostisch ungünstig, insbesondere nach Kapselruptur und Metastasierung. Desweiteren benennt man reife oder adulte Teratome, deren Mehrzahl benigne Dermoidzysten darstellen, faust- bis mannskopfgroß werden und fettig-ölige Flüssigkeit sowie Zähne und Organteile beinhalten können [15]. Die dritte Form bilden die monodermalen Teratome, deren bekannteste die seltene Struma ovarii mit einem Anteil von 2,7% der Teratome ausmacht und überwiegend benigne ist und das ebenso seltene Karzinoid im Dermoid. Die Gesamtheilung aller Teratomarten liegt mit 63% innerhalb von zehn Jahren im oberen Bereich [61].

Der Anteil an Metastasen macht etwa 6-7% der Ovarialtumoren aus, besonders oft werden bilaterale (60-75%) Filiae der Mamma-, Kolon- und Magenkarzinome angetroffen [60].

1.1.3 Risikofaktoren

Risikofaktoren sind unter anderem eine früh einsetzende Menarche und ein spätes Einsetzen der Menopause, Kinderlosigkeit, Sterilität, spätgebärende Frauen, Zahl der Ovulationen, hoher sozioökonomischer Status oder fehlende Stillzeiten sowie Übergewicht. Dieses senkt auch im männlichen Körper den Inhibinspiegel, was dessen Fähigkeit als Tumorsuppressor erklären könnte [98]. Ebenso kommen aber auch genetische Prädispositionen als Ursache in Frage. In ca 5% der Karzinomfälle liegt eine familiäre Häufung vor [66], die womöglich auf eine Chromosomenanomalie (Deletion 17q21) zurückzuführen ist [15]. Außerdem steigt das Erkrankungsrisiko bei Frauen, die selbst bereits an einem Mamma-, Uteruskorpus- oder Kolonkarzinom leiden. Multiparität und langjährige Einnahme hormonaler Ovulationshemmer, durch Verringerung der Ovulationen, scheinen sich dagegen protektiv auszuwirken.

Kombinationspräparate mit Östrogenen und Gestagenen steigern allerdings geringfügig das Brustkrebsrisiko.

In den letzten 20 bis 30 Jahren ist die Inzidenzrate der Ovarialkarzinome in Deutschland nahezu konstant geblieben, wohingegen die Mortalitätsraten seit den 1980er Jahren über die Zeit deutlich sinken. Auch im Trendverlauf zeigt sich somit eine epidemiologische Ähnlichkeit zum Corpuskarzinom des Uterus. Die Prognose eines Ovarialkarzinoms zu anderen malignen Neoplasien der weiblichen Geschlechtsorgane hingegen ist vergleichsweise schlecht. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt nur bei etwa 41%. Der Verlust an Lebenserwartung beträgt statistisch 11 Jahre. Dies liegt einerseits an der späten Diagnose durch fehlende Frühsymptomatik, 75-80% der Fälle werden im ungünstigen Stadium FIGO IIB-IV diagnostiziert. Andererseits wird die 5-JÜR durch eine hohe Rezidivgefahr reduziert, da etwa 75% der Patientinnen ein Rezidiv entwickeln. Allerdings leben Patientinnen, die tumorfrei operiert werden können, signifikant länger, als solche bei denen ein Tumorrest verbleibt. [13,14,73]

1.1.4 Histopathologische Klassifikation und Stadieneinteilung

Nachfolgend die derzeit gebräuchlichen histopathologischen Klassifikations- und Stadieneinteilungsformen:

Histopathologisches Grading gynäkologischer Tumoren nach [89]:

- GX Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
- GB Tumoren von Borderline-Malignität
- G1 Gut differenziert
- G2 Mäßig differenziert
- G3 Schlecht differenziert oder undifferenziert

Die Stadien G1 und G2 werden des Öfteren auch zu „low grade“ die Stadien G3 und G4 zu „high grade“ zusammengefasst. Ein spezielles Gradingssystem, wie es für Karzinome der Leber, Mamma und des Corpus uteri existiert, wurde für das Ovarialkarzinom erstmals 1998 von Silverberg [78] vorgeschlagen. Hierbei werden für die Architektur, Kernpleomorphie und Mitosezahl bis zu maximal neun Punkte vergeben.

Gradingssystem von Silverberg:

Punktwert	1	2	3
Architektur	Glandulär	Papillär	Solide
Kernpleomorphie	Relativ uniforme Vesikuläre Kerne; Kerngrößenvariation $\leq 2 : 1$; keine prominenten Nukleolen	Kerngrößenvariation zwischen $2 : 1$ und $4 : 1$; kleine Nukleolen; keine bizzarren Kerne	Kerngrößenvariation $4 : 1$; große eosinophile Nukleolen, evtl. bizzare Kerne
Mitosezahl			
- Sehfeldzahl 20	0 - 7	8 – 18	≥ 19
- Sehfeldzahl 26	0 – 9	10 – 24	≥ 25

Der Differenzierungsgrad ergibt sich somit aus der Summe der drei Punktwerte:

- 3 – 5 Punkte Gut differenziert (Grad 1)
 6 – 7 Punkte Mäßig differenziert (Grad 2)
 8 – 9 Punkte Schlecht differenziert (Grad 3)

Die gebräuchlichste Einteilung ist jedoch nachfolgende Kombination nach Mayr [54], die auch der Klassifikation der Patientinnen dieser Arbeit zu Grunde lag.

TNM	FIGO	Befundsituation
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
T1a	Ia	Tumor auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	Ib	Tumor auf beide Ovarien begrenzt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars, keine malignen Zellen in Aszites
T1c	Ic	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien, mit Kapselruptur, Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
T2	II	Tumor eines Ovars oder beider Ovarien, Ausdehnung auf das kleine Becken beschränkt
T2a	Ila	Befall von Uterus und/oder Tuben, keine malignen Zellen in Aszites

T2b	IIb	Befall anderer Beckengewebe, keine malignen Zellen in Aszites
T2c	IIc	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
T3	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIa	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b	IIIb	Makroskopische Peritonealmetastasen bis 2 cm Größe jenseits des Beckens
T3c	IIIc	Peritonealmetastasen größer als 2 cm jenseits des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen) (Leberparenchymmetastasen, zytologisch positiver Pleuraerguss, Einbruch in Blase oder Darm)
N		Regionäre Lymphknoten
NX		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1		Regionäre Lymphknotenmetastasen
M		Fernmetastasen
MX		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0		Keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

Abbildung 1: Stadieneinteilung nach dem TNM-System der UICC (International Union against Cancer) und FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique), kombiniert nach Mayr [54]

1.2 Inhibin und Aktivin

Inhibin und Aktivin sind nicht-steroidale, dimere Polypeptidhormone [29], die zur über 40 Liganden umfassenden Superfamilie der Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) der Cytokine gehören [37] [93]. Von den Gonaden produziert, spielen sie eine entscheidende Rolle in der Regulation der hypophysären FSH-Produktion (Follikel Stimulierendes Hormon) und nach neueren Erkenntnissen nehmen sie sogar Anteil an der Aufrechterhaltung der Knochendichte [59]. Die drei bisher am besten erforschten Subspezies, Inhibin- β_A , Inhibin- β_B und Inhibin- α

sind durch Bildung von Homo- und Heterodimeren durch Disulfidbrückenbindungen, strukturell miteinander verwandt [65,86].

Aktivine bestehen lediglich aus den β -Untereinheiten, wohingegen die Inhibine aus je einer α - und einer β -Untereinheit gebildet werden. Activin A ist also das β_A - β_A Homodimer, Inhibin A das β_A - α -Heterodimer und Inhibin B das β_B - α -Heterodimer [35].

Da Inhibin und dessen freie α -Kette in Granulosa-Zell-Tumoren und muzinösen Karzinomen entdeckt wurden, ist ein Serumtest entwickelt worden um deren Auftreten und Therapie überwachen zu können. Es wurde nämlich beobachtet, dass transgene Mäuse mit einer Inhibin α -Ketten-Gendeletion, Stroma- und Granulosa-Zell-Tumoren entwickeln. α -Untereinheiten hingegen scheinen also als Tumor-Suppressor-Gene zu fungieren [8,67,69].

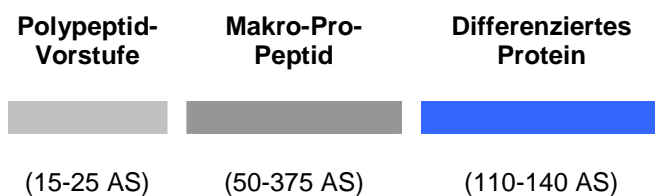


Abbildung 2: Struktur der Precursor-Proteine der TGF- β -Familie

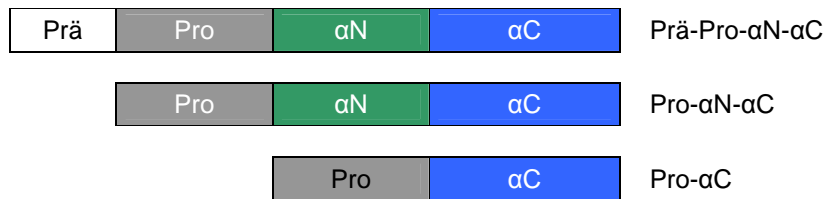
1.2.1 Inhibin

Schon 1923 vermuteten Mottram und Cramer [57] eine Substanz, die, von den Hoden sezerniert, auf die Hypophyse wirkt. Diese Hypothese wurde 1932 von McCullagh [55] bestätigt, indem er bei Versuchen mit wasserlöslichen Gonadenextrakten von kastrierten Ratten ein Hormon isolieren konnte, welches eine starke Suppressionswirkung auf die FSH-Sekretion im Hypophysenvorderlappen zeigte. Auf Grund dieser hemmenden Wirkung bezeichnete er es als Inhibin, nach dem lateinischen „inhibere“. Fast 60 Jahre später, 1989, stellten Hamada et. al [33] das erste Radioimmunoassay vor, das in der Lage war, Inhibin- α -Konzentrationen im Serum zu messen.

1.2.1.1 Struktur und Sekretionsloci

Inhibine sind heterodimere Glykoproteine, die aus einer α - und einer β - Kette bestehen und unabhängig von einander auf verschiedenen Chromosomen codiert sind. α - und β_B -Untereinheiten auf Chromosom 2, die β_A -Untereinheit auf Chromosom 7. Zwischen α - und β -Kette ergibt sich eine Aminosäuren Übereinstimmung von nur 23-27 %, die Homologie der β_A und β_B -Ketten hingegen erreicht immerhin 64 %. Auch zwischen diversen Spezies bleibt diese Homologie weitgehend erhalten. So beträgt zum Beispiel der Unterschied zu Schaf-Inhibin lediglich eine Aminosäure innerhalb der β -Ketten. Jeweils zwei verschiedene Untereinheiten werden durch zwei Disulfid-Brücken miteinander verknüpft [80]. Bioassay, Immunzytochemie und in situ Hybridisierung haben gezeigt, dass Inhibin und seine Untereinheiten nicht nur von den testikulären Sertolizellen, sondern auch von den Granulosazellen des Ovars produziert werden [68]. Es wurden aber auch in einigen weiteren Organen und Geweben wie der Nebenniere, der Leber und im Gehirn, Messenger Ribonukleinsäuren (mRNAs) der Inhibin-Untereinheiten gefunden. Da Inhibindimere nicht im Serum ovariectomierter bzw. orchietomierter Patienten nachgewiesen werden konnten, scheinen Gonaden und Plazenta die einzig nennenswerten Produktionsquellen zu sein [90]. Wie die anderen Mitglieder der TGF- β -Familie werden auch die Inhibine als Precursorproteine synthetisiert. Diese Vorläufer der eigentlichen Moleküle werden anschließend durch diverse Modifikationen in ihre Endform überführt [20].

Modifikationen der Inhibin α -Kette



Modifikationen der Inhibin β -Kette

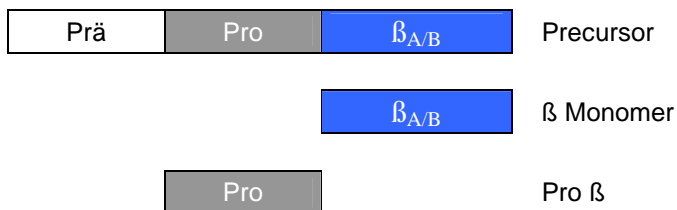


Abbildung 3 : Formen der Precursorproteine des Inhibins

Die α -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 18 kDa haben alle Inhibine gemeinsam. Anhand der zwar strukturell ähnlichen, aber nicht gleichen β -Untereinheiten (≈ 14 kDa) des Hormons erfolgt die Nomenklatur. Zurzeit werden fünf verschiedene β -Ketten unterschieden, β_A bis β_E . Die β -Subunits β_A und β_B dimerisieren zu bisher drei bekannten Proteinen, welche wegen ihrer stimulierenden Wirkung auf die FSH-Sekretion Aktivin genannt werden.

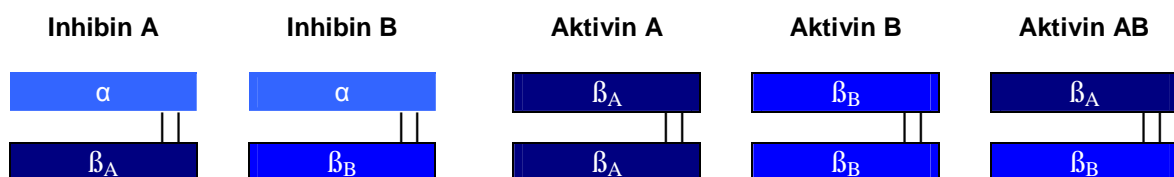


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Homo- und Heterodimere aus entsprechenden prozessierten α - und β -Untereinheiten

1.2.1.2 Weiblicher Zyklus und Inhibinproduktion

Während des menschlichen Menstruationszyklus variieren die Konzentrationen von Inhibin A und B physiologisch in folgender Weise: In der frühen bis mittleren Proliferationsphase ist die Inhibin B Konzentration, gemeinsam mit der des FSH, am höchsten in der Zyklusmitte, wohingegen in der Sekretionsphase die höchsten Konzentrationen von Inhibin A nachweisbar sind. Im Zusammenspiel von Östradiol und Progesteron wird dabei FSH auf sein niedrigstes Niveau während des ganzen Zyklus gesenkt. Aber auch im Laufe der Pubertät, der Schwangerschaft und während und nach der Übergangsphase zur Menopause variiert das Sekretionsmuster der Inhibine.

In der Pubertät steigen die Spiegel von Inhibin A und B mit dem Lebensalter an und erreichen in der Pubertätsmitte ihren Konzentrationsgipfel. Daher wird vermutet, dass der Syntheseort für Inhibin B die kleinen antralen Follikel des Ovars sind. Inhibin A hingegen wird offensichtlich in den großen sprungreifen Follikeln bzw. in den luteinisierten Granulosazellen produziert [38,56,90]. Postpubertär sinken die Spiegel wieder auf ein konstantes Niveau, welches höher liegt als präpubertär. Man geht deshalb davon aus, dass die Inhibinsekretion als Marker für die ovarielle bzw. follikuläre Entwicklung dienen kann [39], beispielsweise in der Diagnostik der Pubertas præcox. In der Menopause sinken die Inhibinlevel dann auf ein Minimum oder sind überhaupt nicht mehr nachweisbar [80].

Nicht nur, aber besonders in der Gruppe von postmenopausalen Patientinnen mit Ovarialkarzinomen, dienen Inhibine also als wertvolle Tumormarker.

1.2.1.3 Inhibin und Neoplasien

Da Inhibin von den Gonaden exprimiert wird, überrascht es nicht, dass sich dessen Konzentration im Rahmen von Erkrankungen, welche die Gonaden in Mitleidenschaft ziehen, verändert [56]. Hierzu gehören nicht nur Trisomien, Diabetes Mellitus oder Prä-Eklampsie, während der Gravidität, sondern nahe liegender Weise auch Krankheiten der Ovarien, insbesondere Neoplasien. Der Inhibin A Anstieg im Serum von Frauen mit Granulosa-Zell- und muzinösen Karzinomen wurde bereits in vielen Studien mit einander in Zusammenhang gebracht

[17,26,69,77]. Robertson beschrieb 1999 deutlich erhöhte Inhibin A, B und Pro- α -C-Konzentrationen bei allen Patientinnen mit Granulosazelltumoren [42,68].

In den Fällen mit muzinösen Karzinomen konnten nur in 60-70%, in serösen nur in 35% der RIA-Untersuchungen Konzentrationsanstiege bestimmt werden [12]. Eine verminderte Inhibinwirkung ließe sich allerdings auch durch einen Verlust entsprechender Rezeptoren im Tumor selbst erklären [30]. Die Inhibinkonzentration fällt jedoch auch nach der operativen Tumorentfernung, und wird erst wieder bei Bildung eines Tumorrezidivs nachweisbar. Daher erscheint es ratsam, den präoperativen Spiegel zu bestimmen, um postoperativ das Rezidivrisiko abschätzen zu können. Ob dessen Erhöhungen direkt mit der Pathogenese der Ovarialkarzinome zusammenhängen, müssen weitere Studien zum Vorhandensein und Funktion von Inhibinrezeptoren ergeben.

Es wurde festgestellt, dass ein, vor der Operation über dem Mittelwert liegender, Inhibin A Spiegel, die 5-JÜR verschlechtert. Ebenso wurde herausgefunden, dass Inhibin A und B als Marker für die Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle der gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen (Gestational Trophoblastic Disease; GTD), wie dem Chorionkarzinom, dienen können. Humanes Choriongonadotropin (hCG) und seine freie Untereinheit hCG β sind zwar aktuell etablierte Marker dieser Erkrankung, da weniger vollständiges hCG, dafür mehr der hCG β -Untereinheit sezerniert wird, haben aber keinen Vorhersagewert für die Pronose. Es wurde jedoch bewiesen, dass Inhibin A einen großen Nutzen für die Erkennung der GTD besitzt, da es in Trophoblastenzellen nachgewiesen werden konnte. In diesem Fall bieten daher hCG- und Inhibin-Analysen eine genauere Diagnosekombination.[66]

Auch in der Progression von Prostata-, Mamma-, Pankreas-, Nebennieren- und Hypophysentumoren scheint Inhibin A eine Rolle zu spielen. Allerdings ist noch nicht hinreichend erforscht, ob Inhibin an der Entstehung oder lediglich dem Wachstum dieser Erkrankungen Anteil nimmt [7]. Tsuchida et al. stellte nicht nur den Zusammenhang der TGF- β -Familie mit der Karzinompathogenese her, sondern auch die Beteiligung an der Entstehung von Muskeldystrophien, Adipositas und Umbau der Knochenstruktur her [85].

Das Wissen, dass Inhibine am endokrinen Regulationsmechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse teilhaben [98], macht dessen Serumspiegelschwankungen zu einem wichtigen Marker für Verständnis und potenzieller Entdeckung verschiedenster Erkrankungen in sämtlichen Lebensabschnitten [66].

1.2.2 Aktivin

Aktivine sind Homo- bzw. Heterodimere der β - Untereinheit der Inhibine. Die geläufigsten Formen sind Aktivin A, B und AB, es wurden aber auch die Formen C, D und E entdeckt [23]. Über deren biologische Bedeutung ist allerdings erst wenig bekannt, abgesehen von ihrer Wirkung auf die Follikelreifung im Zusammenspiel mit Östrogen und FSH. Hierbei scheint besonders Aktivin B beteiligt zu sein, wie tierexperimentelle Studien mit Mäusen zeigen konnten [38]. Aktivin C und E werden in höchstem Maße in der Leber exprimiert, ihre biologische Aktivität ist aber noch nicht bewiesen [44]. Während für Aktivin A bereits Einzelheiten zur Signal-Transduktion bekannt sind, konnte bisher noch nichts Näheres über Struktur und Lage des Inhibin-Rezeptors in Erfahrung gebracht werden.

1.2.2.1 Signalweg und Rezeptoren

Zu Beginn des Signal-Weges von TGF- β -1 und Aktivin A binden die Liganden an Homodimere des Typ-II-Rezeptors, die Typ-I-Rezeptoren werden durch Phosphorylierung aktiviert, was wiederum die Phosphorylierung zytoplasmatischer SMAD-Proteine zur Folge hat [50]. Das TGF β -1-Signal wird durch den TGF- β -Rezeptor-Typ-II (TGF β -RII) und den TGF- β -Rezeptor-Typ-I (TGF- β -RI), welcher mit ALK5 identisch ist [81,82], und die sich gemeinsame Wegstrecken mit den Aktivin-Rezeptoren in der SMAD-Kaskade teilen, weitergeleitet [4,6]. Bei Aktivin A erfolgt die Signal-Transduktion durch den Aktivin-Typ-Ib-Rezeptor (Act-RI-b) [19] und durch die Aktivin-Typ-II-Rezeptoren (Act-RII) [88] und Act-RII-b [5]. Der Aktivin-Typ-I-Rezeptor codiert die Serin-Threonin-Kinase SKR1 und leitet lediglich Signale des Knochenmark-Proteins BMP7, jedoch nicht des Aktivins weiter [51]. BMP7 und Aktivin A binden aber beide an dieselben Typ-II-Rezeptoren.

Die Signalweiterleitung durch TGF β -1, Aktivin und Inhibin ist ebenso an der Embryogenese beteiligt [94], wie an der Funktion der Gonaden [32,38] und der Hypophyse [46], sowie an der Erythropoese [95].

Prostata-, Leber-, Nebennieren- und Brustdrüsenzellen [48,79,87,96], werden wiederum durch Aktivin A in ihrem Wachstum gehemmt. Hodentumorzellen in vitro wurden hingegen dazu stimuliert [9]. Auch komplexe Rechts-Links-Achsen-Störungen im Verlauf der humanen

Organogenese lassen sich auf die Aktivinmitwirkung zurückführen. Diese erfolgen durch Veränderungen des Act-RIIb-Rezeptors und resultieren in einem situs inversus [45]. Es scheint allerdings möglich zu sein, die Aktivinwirkung in Hamsteroovarien durch partielle Blockade mittels Inhibin A um etwa 50% zu reduzieren [28]. Inhibin bildet durch Bindung an Proteoglykane einen stabilen β -Glykan-Komplex. Dabei werden Typ I und II Rezeptoren abgespalten. In Anwesenheit von β -Glykanen ist Inhibin auch in der Lage, BMPs (bone morphogenic protein) zu antagonisieren, da deren Funktion von ActRII abhängt [34]. Die Liganden- und Rezeptorstrukturen und deren Signalkaskaden stellen daher eine stabile Basis für Therapien dar, welche regulierend auf Fertilität und verschiedenste Pathomechanismen einzugreifen in der Lage sind [10,11]. Neuere Studien zeigen sogar den Zusammenhang von rapidem Anstieg der Aktivinkonzentration mit subklinischen Läsionen nach Schädelhirntraumata auf. Hierbei ermöglicht die Aktivinbestimmung, Aussagen bezüglich Verlauf und Prognose zu äußern [24].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Fragestellung dieser Untersuchung war,

- ob signifikante Unterschiede in der Gewebe-Expression der Inhibin- α - und β -Untereinheiten im Vergleich benigner mit malignen Erkrankungen zu erwarten,
- und welche davon entsprechend im Serum nachweisbar sind.

Dies geschah

- zum einen durch immunhistochemischen Nachweis der Expression der Inhibin-Untereinheiten α , β A, β B, β C, β E in Gewebsschnitten.
- Zum anderen mittels Konzentrationsmessung der ins Serum sezernierten Dimere Inhibin A und Activin A, B und AB.

Beide Untersuchungsmethoden erfolgten sowohl in der Patientengruppe mit benignen als auch in der mit malignen Tumoren des Ovars.

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv

Das im ELISA verwendete Serum stammte aus Blutentnahmen von 144, zwischen 1921 und 1983 geborenen, nicht-graviden, sowohl prämenopausalen als auch postmenopausalen Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt, der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Patientinnen befanden sich aufgrund maligner und benigner Neoplasien mit Operationsindikation, in den Jahren 2003 bis 2005 in stationärer Behandlung. Intraoperativ wurde den Patientinnen Material zur histologischen Beurteilung durch Mitarbeiter des Pathologischen Instituts entnommen. Die in Paraffin gebetteten Tumore wurden uns mit freundlicher Unterstützung von Fr. PD Dr. med. D. Mayr zur Herstellung von Dünnschnittpräparaten zur Verfügung gestellt.

Histologisch ließen sich an n=83 benignen Tumoren seröse, endometrioid, muzinöse und Corpus Luteum-Zysten, Teratome, sowie Saktosalpinx und einfache Zysten nachweisen. Von den malignen Tumoren wurden n=41 seröse und endometrioid Karzinome in die Auswertung inkludiert. Im Stadium FIGO I befanden sich n=4 der Patientinnen, n=6 im FIGO Stadium II, n=26 im FIGO Stadium III und n=5 Patientinnen wiesen bei Diagnosestellung ein FIGO Stadium IV auf.

Die übrigen Proben mit Infiltration der Ovarien, das Adenokarzinom des Colon, bei Peritonealkarzinose von Mamma- und Vulva-Karzinomen und Krukenbergtumoren beim Magenkarzinom gingen nicht mit in die statistische Auswertung ein.

2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA/EIA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe des ELISA können diverse biomolekulare Substanzen (Proteine, Viren, etc.) und auch niedermolekulare Verbindungen (Hormone, Toxine, Pestizide, etc.) in einer Probe (Serum, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezieller Antikörper zu Nutze,

die das dazu spezifische, nachzuweisende Antigen binden, welches fakultativ in der Probe enthalten ist. Die Antikörper oder teilweise auch das Antigen selbst, werden zuvor mit einem bestimmten Enzym markiert. Die von dem Enzym katalysierte Reaktion, welche sich mittels Chromogen in einem Farbumschlag präsentiert, dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens.

2.2.1 Der Inhibin-ELISA

Der Inhibin ELISA (Ultrasensitive Inhibin A ELISA Kit; Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA) ist ein durch Enzymwirkung beschleunigter Test, der in Sandwich-Technik hochspezifisch Immunkomplexe nachweist. Dabei entsteht ein Komplex aus einem, am Boden jedes Wells gebundenen Antikörper (sog. Coating-AK), dem gesuchten Antigen in dem hinzu gegebenen Medium und einem weiteren enzym-konjugierten Antikörper. Dieser wird im Laufe des Tests hinzugegeben und richtet sich selbst ebenfalls gegen das, mit dem Antigen gekoppelte Enzym. Die beiden AK binden allerdings an unterschiedlichen Stellen des Antigens, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden.

Der Coating-AK mit der Anti-Inhibin β A Untereinheit ist an eine feste Phase gebunden, in diesem Fall an eine 96-Well-Mikrotiterplatte. Nach dem die benötigten Serumproben und Reagenzien des Assay-Kits Zimmertemperatur ($\approx 20^{\circ}\text{-}25^{\circ}\text{C}$) erreichten, wurden diese vor Gebrauch mit dem Minishaker gemischt. Dann wurden 50 μL der Standardproben (im ELISA-Kit enthalten) mit bekannter Konzentration zur Festlegung der Standardkurve, Kontrollen mit hoher und niedriger Konzentration zur Belegung der Testvalidität, und des zu prüfenden Serums mit darin potentiell enthaltenem Antigen in die zugehörigen Wells der Mikrotiter-Platte pipettiert. Außerdem wurden je 25 μL des Probe Puffers A und B, beide auf Proteinbasis und zur Konstanthaltung des pH-Werts, hinzu gegeben.

Die 96-Well-Platte wurde nun bei Zimmertemperatur für drei Stunden auf einem bei ca. 300 U/min kreisenden Varishaker inkubiert. In dieser Zeit bindet das hinzu gegebene Antigen aus den unterschiedlichen Proben an den Antikörper. Anschließend erfolgte das fünfmalige Auswaschen der Wells mit deionisiertem Wasser, um die ungebundenen Bestandteile der Probe zu entfernen. Nun wurden jeweils 50 μL des AK-Biotin-Konjugats (Detektions-AK: biotinylierte Anti-Inhibin A α -Untereinheit IgG) hinzu pipettiert und die bedeckte Platte wiederum bei ca. 300 U/min auf dem Varishaker inkubiert, diesmal für 60 min. Dies geschah zur neuerlichen Bildung eines

Antigen-Antikörperkomplexes mit dem bereits bestehenden, ersten AG-AK-Komplex. Es entstand ein „Sandwich“ aus Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Erneut wurden die Wells fünfmal mit Reinigungslösung, bestehend aus gepufferter Salzlösung und nichtionischem Reinigungsmittel, gewaschen, um auch überschüssigen zweiten AK zu entfernen. Daraufhin wurden 50µL der Streptavidin-Enzym Konjugatlösung (Horseradish peroxidase (HRP): Meerrettichperoxidase) zur Markierung der entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe und Beschleunigung der Reaktion aufgetragen, 15 min. lang unter den oben genannten Bedingungen inkubiert und danach fünfmal etwaige nichtgebundene Reste ausgewaschen. Dies geschah, da Avidin mit Biotin eine sehr hohe Bindungsaffinität besitzt, und somit die Komplexierung des Sekundärantikörpers mit der HRP erleichtert wird.

Im Anschluß erfolgte die 25-minütige Inkubation von 100µL/Well der TMB Chromogenlösung, eines Farbsubstrats welches durch die bereits vorhandene, gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) einen Farbumschlag erzeugte. Dies geschah wieder bei 300 U/min, diesmal jedoch unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung, um einer Zersetzung oder Farbänderung durch Autooxidation vorzubeugen.

Nach Einbringen der 96-Well-Platte in das Photometer, erfolgte die Absorptionsmessung des enzymatischen Substratumsatzes bei 450nm innerhalb von 30 min. nach Auftragen von 100µL Stopplösung (Schwefelsäurelösung). Die hierbei gemessene Absorption war direkt proportional zur vorhandenen Konzentration des zu messenden, freien Stoffes.

Zur graphischen Darstellung der Standardkurve der Absorption wurde der mitgelieferte Satz von Standardproben mit bekannter Konzentration verwendet. Dies erlaubte eine quantitative Bestimmung der absoluten AK-Konzentrationen in Serumproben und Kontrollen anhand der Farbintensität. Stark hämolytische oder lipämische Seren könnten durch Änderung der Farbintensität das Ergebnis verfälschen und wurden daher nicht verwendet.

2.2.1.1 Inhibin A ELISA DSL-10-18200i (Lot-Nr. 891270)

Sensitivität:

Die theoretische Sensitivität bzw. untere Nachweisgrenze beträgt 0,3 pg/ml. Sie wird durch Interpolation des Mittelwerts plus zwei Standardabweichungen von 12 Replikationen des Nullstandards berechnet.

Präzision:

Anhand des Mittelwerts von 12 Replikaten wurde die Intra-Assay-Präzision ermittelt.

Probe	N	Mittelwert (pg/ml)	Standardabweichung (pg/ml)	Variationskoeffizient (%)
I	12	3,11	0,21	6,9
II	12	9,41	0,63	6,8
III	12	17,37	0,91	5,2

Anhand des Mittelwerts von 12 separaten Ansätzen wurde die Inter-Assay-Präzision ermittelt.

Probe	N	Mittelwert (pg/ml)	Standardabweichung (pg/ml)	Variationskoeffizient (%)
I	12	2,99	0,27	8,9
II	12	6,02	0,38	6,4
III	12	10,2	0,37	3,7
IV	12	16,2	0,74	4,6

Wiederfindung: Humanserumproben wurden mit bekannten Inhibin-A-Mengen aufgestockt. Anschließend wurden die aufgestockten und nicht aufgestockten Proben getestet. Die wiedergefundene Konzentration ist der beobachtete Wert, von welchem die gemessene, endogene Inhibin-A-Konzentration abgezogen wurde.

Probe	Endogen (pg/ml)	Zugegeben (pg/ml)	Erwartet (pg/ml)	Gemessen (pg/ml)	Wiederfindung (%)
I	0,293	5	5,29	5,17	98
		9,31	9,60	9,17	95
		17,4	17,69	16,51	93
II	0,41	5	5,41	5,21	96
		9,31	9,72	9,85	101
		17,4	17,81	17,96	101
III	0,836	5	5,84	5,91	101
		9,31	10,15	10,16	100
		17,4	18,24	18,89	104
IV	3,77	5	8,77	9,02	103
		9,31	13,08	13,39	102
		17,4	21,17	22,37	106
V	5,72	5	10,72	11,18	104
		9,31	15,03	16,67	111
		17,4	23,12	24,88	108

Linearität:

Humanserumproben wurden mit Nullstandard verdünnt und analysiert.

Probe	Verdünnungsfaktor	Erwartet (pg/ml)	Gemessen (pg/ml)	Wiederfindung (%)
			20	
I	1:2	10	10,2	102
	1:4	5	4,8	96
	1:8	2,5	2,4	96
	1:16	1,25	1,2	96
II			21,3	
	1:2	10,6	11,3	107
	1:4	5,3	5,7	107
	1:8	2,7	2,7	100
	1:16	1,33	1,22	92
III			28,4	
	1:2	14,2	13,9	98
	1:4	7,1	7,7	108
	1:8	3,5	3,5	100
	1:16	1,8	1,8	100

Methodenvergleich:

Der DSL-10-18200 ACTIVE Ultrasensitive Inhibin-A-ELISA (y) wurde mit einem handelsüblichen Inhibin-A-ELISA-Kit (x) verglichen. Die Regressionsanalyse ergab die folgende Gleichung:

$n = 30$

DSL Inhibin-A-Bereich = 52-1033 pg/ml

Regression: $\text{DSL-10-18200} = 0,57x + 15,6$

$r = 0,996$

2.2.1.2 Inhibin B ELISA DSL-10-84100i (Lot-Nr. 891466)

Sensitivität:

Die theoretische Sensitivität bzw. untere Nachweisgrenze beträgt 7 pg/ml. Sie wird durch Interpolation des Mittelwerts plus zwei Standardabweichungen von 10 Replikationen des Nullstandards berechnet.

Präzision:

Anhand des Mittelwerts von 23 Replikaten wurde die Intra-Assay-Präzision ermittelt.

Probe	N	Mittelwert (pg/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)
I	23	69	2,4	3,5
II	23	274	12,7	4,6
III	23	472	26,5	5,6

Anhand des Mittelwerts von 14 separaten Ansätzen wurde die Inter-Assay-Präzision ermittelt.

Probe	N	Mittelwert (pg/ml)	Standardabweichung (pg/ml)	Variationskoeffizient (%)
I	14	50,1	3,8	7,6
II	14	188,4	11,8	6,3
III	14	355	22,1	6,2

Wiederfindung:

Humanserumproben wurden mit bekannten Inhibin-B-Mengen aufgestockt. Anschließend wurden die aufgestockten Proben getestet.

Probe	Endogen (pg/ml)	Zugegeben (pg/ml)	Erwartet (pg/ml)	Gemessen (pg/ml)	Wiederfindung (%)
I	5,9	120	125,90	134	106
		293	298,90	303	101
		577	582,90	629	108
II	21,4	120	141,40	141	100
		293	314,40	306	97
		577	598,40	591	99
III	21	120	141,00	145	103
		293	314,00	351	112
		577	598,00	682	114

Linearität:

Drei Humanserumproben wurden mit Nullstandard verdünnt und analysiert.

Probe	Verdünnungsfaktor	Erwartet (pg/ml)	Gemessen (pg/ml)	Wiederfindung (%)
			228,4	
I	1:2	114	113,9	100
	1:4	57	57	100
	1:8	28	27	96
			229,5	
II	1:2	114	119,1	104
	1:4	57	62,5	109
	1:8	29	32,4	110
			251,6	
III	1:2	126	131,2	102
	1:4	63	62,9	97
	1:8	31	29,4	87

Methodenvergleich:

Der DSL-10-84100 ACTIVE Inhibin-B-ELISA (y) wurde mit einem handelsüblichen Inhibin-B-ELISA-Kit (x) verglichen. Die Regressionsanalyse ergab die folgende Gleichung:

$$n = 109$$

$$\text{DSL Inhibin-B-Bereich} = 10\text{-}531 \text{ pg/ml}$$

$$\text{Regression: DSL-10-84100} = 1,16x + 9,65$$

$$r = 0,91$$

2.2.2 Der Aktivin-ELISA

Der Aktivin-ELISA (Free Activin ELISA Kit Lot-Nr. Activin A 07284, Activin B 07210, Activin AB 07277; Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA) erfolgte weitestgehend nach demselben Prinzip wie der Inhibin-ELISA. Deshalb soll im folgenden Abschnitt besonders auf die aktivin-spezifischen Schritte eingegangen werden.

Bei diesem Test zur Aktivinbestimmung handelt es sich um einen „one-step“ Sandwich-ELISA. Dies bedeutet, das Enzym ist bereits in der Konjugatlösung enthalten und es entfällt der Schritt des gesonderten Auftragens.

Nachdem die benötigten Serumproben und Reagenzien des Assay-Kits Zimmertemperatur ($\approx 20^{\circ}\text{-}25^{\circ}\text{C}$) erreichten, wurden diese vor Gebrauch mit dem Minishaker gemischt und die AK-Enzym Konjugatlösung hergestellt. Dies geschah durch Verdünnung des jeweiligen Aktivin AK-Enzym Konjugat-Konzentrats (Anti-Aktivin konjugiert mit HRP) mit der im KIT enthaltenen Pufferlösung. Dann wurden je 100 μL der Standardproben mit bekannter Konzentration zur Festlegung der Standardkurve, Kontrollen mit hoher und niedriger Konzentration zur Belegung der Testvalidität, und des zu prüfenden Serums in die zugehörigen Wells der Mikrotiter-Platte pipettiert. Außerdem wurden je 25 μL (Aktivin A) oder 50 μL (Aktivin B und AB) der vorbereiteten AK-Enzym Konjugatlösung hinzugegeben. Die 96-Well-Platte wurde nun bei Zimmertemperatur für zwei Stunden (Aktivin A) bzw. drei Stunden (Aktivin B und AB) auf einem kreisenden Varishaker bei ca. 300 U/min inkubiert.

Auch hier wurde in dieser Zeit das, in den Proben enthaltene, Antigen an den Antikörper gebunden. Ebenso erfolgte die Bildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes („Sandwich“-Bildung, hier jedoch in nur einem Schritt). Anschließend erfolgte das fünffmalige Auswaschen der Wells mit Waschlösung, um eventuelle nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Im Rahmen der Aktivin Assaydurchführung wurde direkt im Anschluß an das Auswaschen, 100 μL der TMB Chromogenlösung in jedes Well gegeben und 10 min. bei ActA und B bzw. 15 min bei Act AB, auch hier wieder unter Vermeidung direkten Sonnenlichts, bei 300 U/min inkubiert. Nach Auftragen von 100 μL Stopplösung (Schwefelsäurelösung) erfolgte das Einbringen der 96-Well-Platte in das Photometer und die Absorptionsmessung des enzymatischen Substratumsatzes ebenso bei 450nm innerhalb von 30 min.

2.3 Verarbeitung der Gewebeproben

2.3.1 Einbettung in Paraffin

Um die Autolyse des Gewebes zu verhindern, mussten die entnommenen Präparate zunächst mit 4%igem, gepuffertem Formalin (Formaldehydlösung) fixiert werden. Dadurch wird die Enzymaktivität im Gewebe gestoppt und die Proteine durch Anlagerung von Formaldehydmolekülen vernetzt. Dies sollte möglichst in dunkler und kühler Umgebung erfolgen, um einer Oxidation des Formalins zu Ameisensäure entgegenzuwirken. Dass dabei die Proteine möglichst wenig denaturiert werden ist notwendig, um später vorhandene Antigenstrukturen zu detektieren. Die Fixationsdauer war abhängig von der Gewebegröße und konnte bis zu 48 Stunden in Anspruch nehmen.

Im Anschluß wurde das Fixationsmittel mit Leitungswasser ausgewaschen. Es folgte das Entwässern der Gewebeproben mit einer Reihe aus einem 70%igem, und mehreren absoluten Ethanolen. Dann wurden die Präparate dem Intermedium Xylol ausgesetzt, welches sich sowohl mit Ethanol als auch mit Paraffin vermischen lässt, und dadurch auch die letzten Wasserrückstände aus dem Gewebe entfernt werden können. An sämtliche Stellen, an denen sich zuvor Wasser befand, drang nun das auf 60°C erhitzte, flüssige Paraffin vor.

Daraufhin konnten die kompletten Präparate in Blockform in Paraffin gegossen werden. Nach Aushärten der Blöcke, wurden diese im Gefrierschrank stark abgekühlt, um eine bessere Schnittverarbeitung im Schlittenmikrotom zu ermöglichen. Die dabei angefertigten, etwa 2-3µm dicken Gewebsschnitte wurden auf speziell für immunhistochemische Färbungen beschichtete SuperFrostPlus-Objektträger gezogen. Diese lagerten dann über Nacht bei etwa 56-58°C im Trockenschrank, was ein noch besseres Anhaften der Schnitte an der Glasoberfläche bewirkt.

2.3.2 Immunhistochemische Aufarbeitung

Zunächst wurde das auf den Objektträgern (zu untersuchende Patientinnenschnitte und Kontrolle einer 39jährigen prämenopausalen Patientin) haftende, fixierte Gewebe 15 min. lang im Xylolbad

entparaffiniert. Anschließend entfernte ein zweiminütiges Eintauchen der, sich in einer Färbeschaukel befindlichen Objektträger, in 100% Ethanol das Xylol.

Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase durch eine Lösung von 3%igem H_2O_2 in Methanol (3ml 30%iges H_2O_2 + 97ml Methanol) blockiert. Endogene Peroxidase findet sich hauptsächlich in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten, weniger in Dünndarmgewebe und in Nervenzellen. Würde die endogene Peroxidase nicht blockiert, könnte man bei der nachfolgenden Substrat-Chromogen-Reaktion nicht unterscheiden, ob die Peroxidase aus dem ABC-Kit stammt, oder bereits als endogene Form vorhanden war. Die erfolgte Blockierung zeigte sich im nach hinein durch farblos bleiben der Erythrozyten.

Im Anschluss wurden die Objektträger zwei Minuten in 70%-iger und noch mal zwei Minuten in 50%-iger Ethanollösung gegeben. Um den Alkohol wieder zu entfernen, wurden die Objektträgerstände anschließend kurz in Aqua dest. gegeben. Da durch die Aldehydvernetzung im Rahmen der Fixierung mit Formalin auch die Antigenbindungsstellen blockiert wurden, mussten diese demaskiert werden. Das Freilegen der Epitope wurde durch fünfminütiges Kochen der Schnitte in einer kalziumpräzipitierenden Lösung, Na-Citratpuffer erreicht.

Anschließend wurden die Objektträger in Leitungswasser abgekühlt, in Aqua dest. gespült und zweimal je zwei min. in PBS gewaschen. Auf diesen Schritt erfolgte eine 20minütige Blockierung (3 Tropfen Normalserum auf 10ml steriles PBS) zur Absättigung elektrostatischer Ladungen im Gewebe und Verhinderung unspezifischer hydrophober Bindungen durch Immunglobuline an Membranen und Fettbewebe. Das Blockierserum wurde anschließend abgeschüttet und 200 μL Primärantikörper (Inhibin α : MCA951S, Klon R1 (Maus), Inhibin βA : MCA9560S Klon E4 (Maus), Inhibin βB : MCA1661 Klon C5 (Maus); alle Serotec, North Carolina, USA; Inhibin βC : AF1629 polyklonal (Ziege); R+D Systems Inc., Minnesota, USA, Inhibin βE : 6620 polyklonal (Kaninchen); Biogenes Gesellschaft für Biopolymere mbH, Berlin) auf jeden Schnitt gegeben. Dieser konnte bei 4°C über Nacht inkubieren, an die entsprechenden Rezeptoren des Antigens binden und die Überstände wurden am nächsten Morgen wieder durch zweimal zwei min. langes Waschen mit PBS entfernt. Darauf folgte das 30minütige Einwirken des mit Biotin markierten Brücken- oder Sekundärantikörpers (3Tr. Normalserum + 1Tr. Anti-mouse-IgG (blau) + 10ml steriles PBS). Dieser ist gegen das Fc/Fab-Fragment des Primärantikörpers gerichtet.

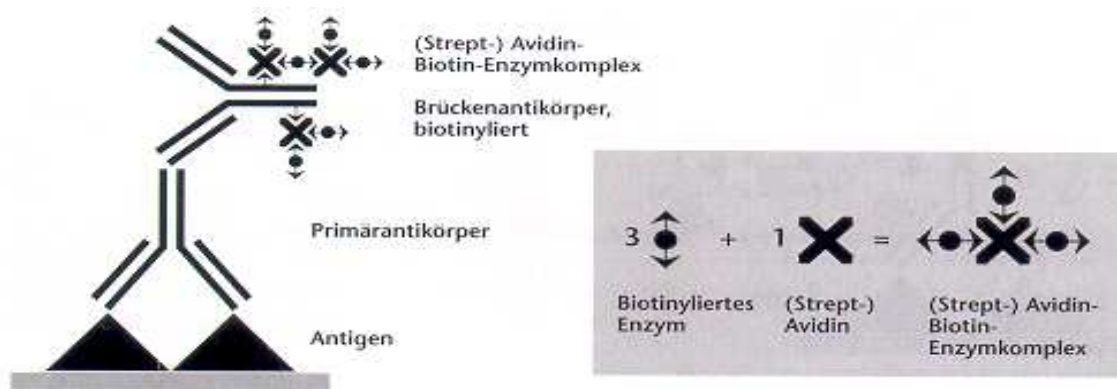


Abbildung 5. Bildung des ABC-Komplexes (Praxis der Immunhistochemie; S. Noll, S. Schaub-Kuhnen; Urban & Fischer Verlag, 2000)

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, welches durch Koppelung an den Brückenantikörper die Verbindung zum ABC-Komplex herstellt. Überwiegend wird hierfür ein Multilink-AK verwendet, der sich aus Brückenantikörpern verschiedener Tierspezies (z.B. Maus, Kaninchen, Pferd usw.) zusammensetzt.

Zwischenzeitlich wurde der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) angesetzt (4Tr. Reagenz A + 4Tr. Reagenz B + 10ml steriles PBS), da dieser mind. 30 min. vor Verwendung ruhen muss. Nach erneutem Waschen, zweimal zwei Min. in PBS, wurde der ABC-Komplex aufgetragen.

Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes, tetrameres Glycoprotein und besitzt vier Bindungsstellen und eine sehr hohe Affinität für Biotin. Da es bei der Verwendung von Avidin teilweise zu unspezifischen Reaktionen kommt, wurde auf gentechnischem Weg ein reineres Produkt gewonnen, Streptavidin, welches aus dem Bakterium „*Streptomyces avidinii*“ isoliert wird. Der ABC-Komplex ist in einer Weise konzipiert, dass nur an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin gebunden wird. Desweiteren wurde dem ABC-Komplex ein Enzym hinzugefügt, Meerrettichperoxidase (HRP), das für die Konjugation des Komplexes verantwortlich ist. Über die freie Bindungsstelle des ABC-Komplexes erfolgt die Konjugation mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper.

Wieder wurde im Anschluss zweimal zwei Min. in PBS gewaschen und daraufhin 2-5 min mit 3,3, Diaminobenzidin (1Tr. DAB-Chromogen + 1ml Substratpuffer) gefärbt. Chromogen bildet in Kombination mit Substratpuffer (H_2O_2) und HRP aus dem ABC-Komplex als Katalysator einen braunen Farbkomplex. Diese Farbreaktion wurde durch Waschen in Aqua dest. für zweimal zwei min. gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte zwei min. lang in saurem Hämalun nach P. Mayer,

eines basischen Farbstofflacks in saurer Lösung (ca. pH 4,5). Bei diesem pH-Wert verfügen lediglich noch die Zellkerne über eine negative Ladung, daher färbten sich ausschließlich diese an. Der positiv geladene, basische Farbstoff wurde an die negativ geladene Phosphatgruppe der DNS im Zellkern gebunden.

Während des anschließenden Bläuens, fünf min. lang im alkalischen Leitungswasser, wurden noch vorhandene Säurereste entfernt. In der nun folgenden aufsteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 70%igem, 96%igem und absolutem Ethanol, wurden die gefärbten Schnitte entwässert und in Carbolxylol und Xylol durch Alkoholentzug aufgehellt. Xylol diente hierbei als Intermedium zwischen Alkohol und dem lösungsmittellöslichem Eindeckmedium VitroClud. Mit einem Einschlussmittel für mikroskopische Technik, welches denselben Brechungsindex besitzt wie Glas, und Spezialdeckgläsern, wurden die Präparate luftdicht eingeschlossen.

2.3.3 Kontrollen

Um die Validität der Ergebnisse zu Verifizieren, sind Versuchs- und Reagenzienkontrollen notwendig, um zu gewährleisten, dass die erzielten Ergebnisse verlässlich sind. Daher wurden bei jedem Färbevorgang, zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, also Anfärbung von Geweben, in denen nicht mit Antigenen zu rechnen ist, Substitutions- und Negativkontrollen nach derselben Vorgehensweise behandelt, wie die zu überprüfenden Schnitte.

Bei der Positivkontrolle handelte es sich um das Gewebspräparat eines kompletten Ovarialkarzinoms, welches in Granulosa- und Thekazellen sicher das fragliche Antigen enthielt. Dies diente der Überprüfung der Sensitivität des benutzten Antikörpers. Darüber hinaus hätten so methodisch bedingte Schwankungen der Färbeintensität entdeckt werden können.

Bei der Negativkontrolle handelte es sich um Ovarialgewebe, welches kein Antigen enthielt, um eine eventuelle unspezifische Bindung des Antikörpers festzustellen.

Um falsch positive Ergebnisse auszuschliessen wurde auch das Detektionssystem getestet. Hierbei wurde das antigenenthaltende Ovar lediglich mit dem Sekundärantikörper, DAB und dem ABC-Kit inkubiert, jedoch nicht mit dem Primärantikörper.

2.3.4 Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Analyse der Gewebsschnitte erfolgte mittels des Immunreaktiven Scores (IRS) von Remmele und Stegner [64]. Dieser Score gibt neben dem Prozentsatz positiver Zellen auch deren Färbeintensität an, um die deskriptive Aussage, welche mittels eines Mikroskops getroffen wurde, in eine statistisch verwertbare numerische zu konvertieren. Danach ergibt sich zur Beurteilung der Expression eines Antigens die Produktbewertungszahl für jedes Präparat aus der Formel:

$$\text{IRS} = \text{SI} \times \text{PP}$$

(SI: Staining Intensitiy; PP: Prozentsatz positiver Zellen)

Die Färbeintensität SI bewertet den vorherrschenden Intensitätsgrad der Färbung von 0 bis 3 wie im Folgenden:

0 = keine Färbereaktion

1 = schwache Färbereaktion

2 = mäßige Färbereaktion

3 = starke Färbereaktion

Der Prozentsatz positiver Zellen (PP) erfolgte nach der Abschätzung des Verhältnisses positiver Karzinomzellen zu den negativen Zellen.

0 = keine positiven Zellen

1 = weniger als 10% positive Zellen

2 = 10-50% positive Zellen

3 = 51-80% positive Zellen

4 = mehr als 80% positive Zellen

Die Multiplikation beider Bewertungsfaktoren ergibt einen IRS von 0 bis 12 Punkten. Um die Subjektivität der Bewertung zu minimieren, wurde zu Beginn jeder Auswertung neben dem

Standard höchstpositiver Färbung in Form der Positivkontrolle auch ein Standard höchstnegativer Färbung beurteilt.

2.4 Verwendete Materialien

ELISA	Bezugsquelle
Ultrasensitive Inhibin A ELISA Kit	Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA
Free Activin A ELISA Kit	Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA
Free Activin B ELISA Kit	Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA
Free Activin AB ELISA Kit	Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA
Vollentsalztes Wasser	Apotheke Innenstadt, LMU München Pettenkoferstr.

Immunhistochemie	Bezugsquelle
Citratpuffer:	(Lsg. A: 21,01g 0,1M Citronensäure (Merck#244) + 1l Aqua dest.; Lsg. B: 29,41g 0,1M Na-Citrat (Merck#6448) + 1l Aqua dest.; Lsg.A + 82ml Lsg.B + 900ml Aqua dest.)
0,1M Citronensäure	Merck, Darmstadt
0,1M Na-Citrat	Merck, Darmstadt
3,3-Diaminobenzidin in Chromogenslg.	DakoCytomation, Inc., California, USA
Antikörper	Serotec, North Carolina, USA
Inhibin α : MCA951S, Klon R1 (Maus)	Serotec, North Carolina, USA
Inhibin β A: MCA9560S Klon E4 (Maus)	Serotec, North Carolina, USA
Inhibin β B: MCA1661 Klon C5 (Maus)	Serotec, North Carolina, USA
Inhibin β C: AF1629 polyklonal (Ziege)	R+D Systems Inc., Minnesota, USA
Inhibin β E: 6620 polyklonal (Kaninchen)	Biogenes Gesellschaft für Biopolymere mbH, Berlin
Aqua destillata	Noll, München
Ethanol 50% mit MEK verg.	Apotheke Innenstadt, LMU München Pettenkoferstraße
Ethanol 70% mit MEK verg.	Apotheke Innenstadt, LMU München Pettenkoferstraße
Ethanol 80% mit MEK verg.	Apotheke Innenstadt, LMU München Pettenkoferstraße
Ethanol 96% mit Methylethylketon verg.	Apotheke Innenstadt, LMU München Pettenkoferstraße
Ethanol, absolut mit Petrolether vergällt	Apotheke Innenstadt, LMU München Pettenkoferstraße
Imidazol-HCL Puffer	DakoCytomation, Inc., California, USA

Methanol (CH ₃ OH)	J.T. Baker, Deventer, Holland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Saures Hämalaun (nach P. Mayer)	Apotheke Innenstadt, LMU München Pettenkoferstraße
Ultra V Block	Lab Vision Corporation, California, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., California, USA
Vitro Clud Einschlußmittel f. mikroskop. Technik	R. Langenbrinck, Emmerdingen
Wasserstoffperoxidlg. 30%, reinst	Apotheke Innenstadt, LMU München Pettenkoferstraße
Xylol, reinst	J.T. Baker, Deventer, Holland

Ge- und Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
8-Kanalpipette Research 30-300µl	Eppendorf, Hamburg
Combitips 1,25ml	Eppendorf, Hamburg
Combitips 2,5ml	Eppendorf, Hamburg
Combitips 5ml	Eppendorf, Hamburg
Dampfkochtopf Vita Fit	Fissler GmbH, Idar-Oberstein
Deckgläser 24 x 60mm spezial	R. Langenbrinck, Teningen
Erlmayerkolben 1000ml	Schott, Mainz
Falconröhrchen Blue Max 15+50ml	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Färbekammer (dunkel mit Deckel)	Werkstatt, Univ. FK Innenstadt
Gefrierschrank	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Glasküvetten	Hellma GmbH & Co KG, Müllheim
Kochplatte	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Kühlschrank Bosch cooler electronic	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Laborwecker Mod TR118	Oregon Scientific, Inc., Oregon, USA
Meßzylinder Plastibrand	Milan SA, Genf, Schweiz
Minishaker MS1 (Vortex)	IKA-Works, Inc., North Carolina, USA
Münchener Mappen	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Objektträger SuperFrost Plus 25x75x1,0	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig

Objektträgerfärbegestell	Hellma GmbH & Co KG, Müllheim
Photometer Dynex MRX II	Dynex Technologies, Virginia, USA
Pipettenspitzen, steril, Filter 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, steril, Filter 100µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, steril, Filter 10µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, steril, Filter 300µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, steril, Filter 5000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Serologische Pipette 5ml + 10ml	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Trockenschrank	Heraeus GmbH, Hanau
Untersuchungshandschuhe sempercare	Semperit, Wien, Österreich
Variable Pipette Reference 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Variable Pipette Reference 10-100µl	Eppendorf, Hamburg
Variable Pipette Reference 1-10µl	Eppendorf, Hamburg
Variable Pipette Reference 500-5000µl	Eppendorf, Hamburg
Vari-shaker #G935	Dynatech Guernsey, GB
Mikroskop Orthoplan 946828	Leitz, Wetzlar
Kamera 3ccd, c-mount	JVC Victor Company, Japan
Objektiv 2,5-fach	Leitz, Wetzlar
Objektiv 10-fach	Leitz, Wetzlar
Objektiv 25-fach	Leitz, Wetzlar
Objektiv 40-fach	Leitz, Wetzlar

2.5 Statistische Analyse

Zur Dokumentation und Datenverwaltung diente das Microsoft Tabellenkalkulationsprogramm Excel. Die statistische Auswertung und die grafische Darstellung erfolgte mittels des Datenanalyseprogramms SPSS Version 14.0.

Angewendet wurden der Kruskal-Wallis-Test für nichtparametrische Tests zur explorativen Datenanalyse und der Mann-Whitney-U-Test. Diese wurden anhand von Boxplot-Diagrammen dargestellt, deren horizontale Linie als Quantil in der Mitte den Median markiert. Die 75. Perzentile wird durch die obere, die 25. Perzentile durch die untere Begrenzung des Rechtecks markiert, die sich dadurch ergebenden Flächen werden Quartile genannt. Die Länge der Box, auch als Interquartilabstand bezeichnet, ist ein Mass für die Streuung der Werte. Die vertikalen Linien, die Fehlerbalken, entsprechen maximal das 1,5fachen des Interquartilabstands. Die des unteren Fehlerbalkens ergeben das 2,5% Quantil, die des oberen das 97,5% Quantil. Somit befinden sich 95% aller beobachteten Werte Innerhalb der Fehlerbalkengrenzen. Darüber oder darunter liegende Werte werden als Ausreisser angegeben. Treten diese mehr als eineinhalb Boxplotlängen außerhalb auf, werden sie mit einem Kreis, mehr als drei Boxplotlängen außerhalb mit einem Stern markiert.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird bei ($p < 0,05$) als signifikant, bei ($p < 0,01$) als hoch signifikant und ($p < 0,001$) als höchst signifikant definiert. Als nicht signifikant gelten Werte von ($p > 0,05$).

3 Ergebnisse

Im vorliegenden Ergebnisteil wurden die Serumkonzentrationen des Inhibin A sowie der Activine A, B und AB mittels ELISA gemessen, um die Expression deren entsprechender Untereinheiten immunhistochemisch in Tumorgewebe nachzuweisen. Für Inhibin B konnte bisher keine ausreichende Unterscheidungsmöglichkeit verschiedener Tumore erbracht werden.

Es erfolgte ein Vergleich mit den Serumdaten von zwischen 1921 und 1983 geborenen, nicht-graviden Patientinnen, welche sich sowohl vor, als auch nach der Menopause befanden. Der Vergleich bezog an malignen Tumoren leidende Patientinnen $n=41$ und Patientinnen mit benignen Tumoren $n=83$ mit ein. Waren erhebliche Unterschiede der Serumkonzentration beweisbar, erfolgte die Aufschlüsselung innerhalb benigner und maligner Subgruppen, um auch hier wieder einen eventuellen, signifikanten Unterschied innerhalb dieser Erkrankungen zu Quantifizieren. Hierdurch wurde die Möglichkeit geschaffen, diverse Tumorsubgruppen anhand deren Inhibin-, bzw. Aktivinkonzentrationen zu klassifizieren.

Selbiges geschah mittels immunhistochemischer Aufarbeitung und anschließender Auswertung der Anfärbbarkeit von Gewebe der Patientin mit entsprechender Erkrankung. Anschließend wurde eine Korrelation der Serumdaten und der Gewebeexpression ein und derselben Patientin untersucht, um Rückschlüsse auf die Tumorart sowie deren Dignität anhand von Serumdaten zu ermöglichen.

Histologisch ließen sich an $n=83$ benignen Tumoren seröse $n=29$, endometrioide $n=9$, muzinöse $n=9$, Corpus Luteum-Zysten $n=6$, Teratome $n=5$, sowie Saktosalpinx $n=3$ und einfache Zysten $n=5$ nachweisen.

Von den $n=41$ malignen Tumoren wurden $n=26$ seröse und $n=6$ endometrioide Karzinome in die Auswertung inkludiert. Im Stadium FIGO I befanden sich $n=4$ der Patientinnen, $n=6$ im FIGO Stadium II, $n=26$ im FIGO Stadium III und $n=5$ Patientinnen wiesen bei Diagnosestellung ein FIGO Stadium IV auf.

Die übrigen Proben mit Infiltration der Ovarien, Adenokarzinome des Colon, bei Peritonealkarzinose von Mamma- und Vulva-Karzinomen und Krukenbergtumoren beim Magenkarzinom gingen nicht in die statistische Auswertung ein.

Es erfolgte die graphische Darstellung anhand von Boxplot-Diagrammen und nicht von Säulendiagrammen, weil somit die Möglichkeit einer graphischen Aufarbeitung für die Streuung der gemessenen Werte möglich war. Insbesondere der Median sowie die Menge der Ausreißer und Länge der Perzentilen konnten so dargestellt und optisch optimal erfasst und bewertet werden.

3.1 Serumanalyse

3.1.1 Vergleich der Serumkonzentration von Inhibin A im Serum von Patientinnen mit malignen, mit dem der Patientinnen mit benignen Erkrankungen

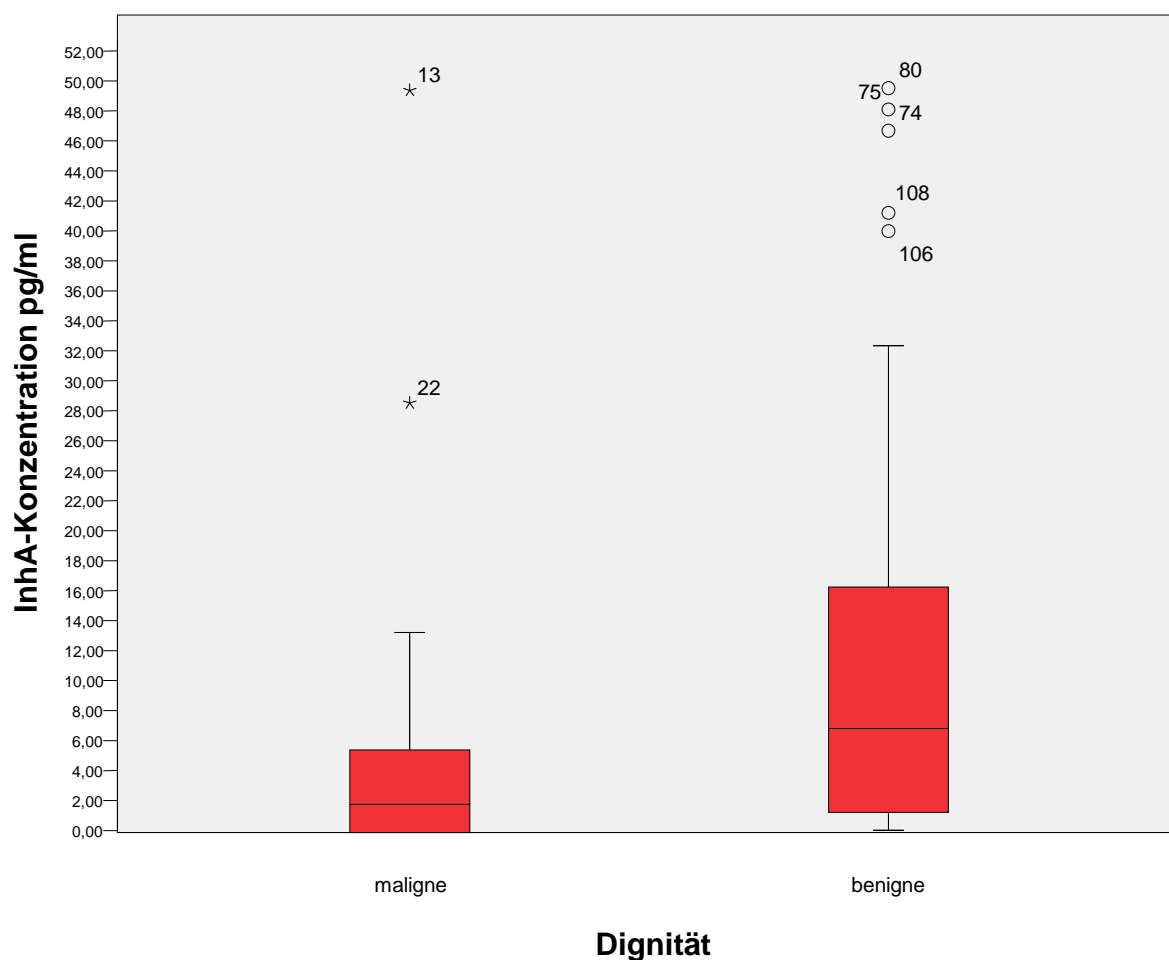


Abbildung 6.. Darstellung der Serumkonzentrationen benigner vs. maligner Erkrankungen

Die Inhibin A Konzentration zeigt sich in der Gruppe der benignen Erkrankungen höchst signifikant erhöht.

	Inhibin A
Asymptotische Signifikanz	0,001

Tabelle 1. p-Wert für den Vergleich der Inhibin A-Konzentration im Serum von Patientinnen mit benignen bzw. malignen Erkrankungen.

3.1.2 Vergleich der Serumkonzentration der Aktivine im Serum von Patientinnen mit malignen, mit dem der Patientinnen mit benignen Erkrankungen

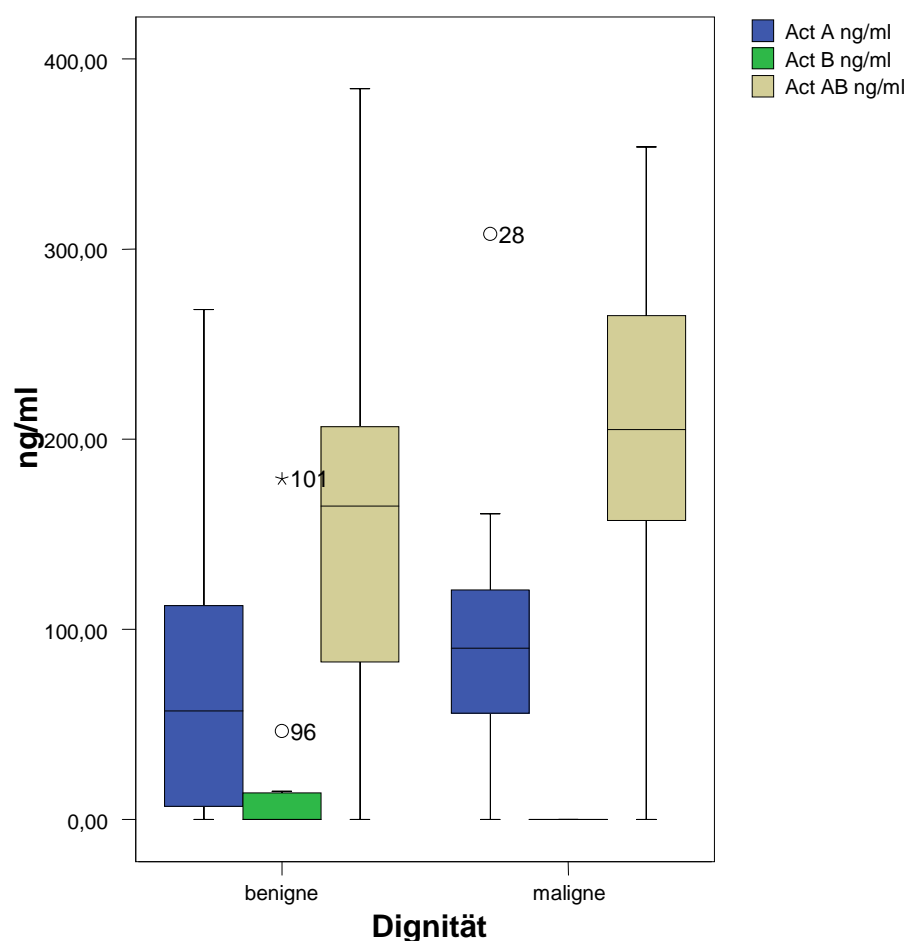


Abbildung 7. Darstellung der Serumkonzentrationen benigner vs. maligner Erkrankungen.

Nur Aktivin B zeigte in der Gruppe der benignen Erkrankungen eine signifikante Konzentrationserhöhung.

	Aktivin A	Aktivin B	Aktivin AB
Asymptotische Signifikanz	0,973	0,015	0,529

Tabelle 2. p-Werte für den Vergleich der Aktivinkonzentrationen im Serum von Patientinnen mit benignen bzw. malignen Erkrankungen.

3.1.3 Vergleich der Serumkonzentration des Inhibin A im Serum von Patientinnen innerhalb der malignen Erkrankungen

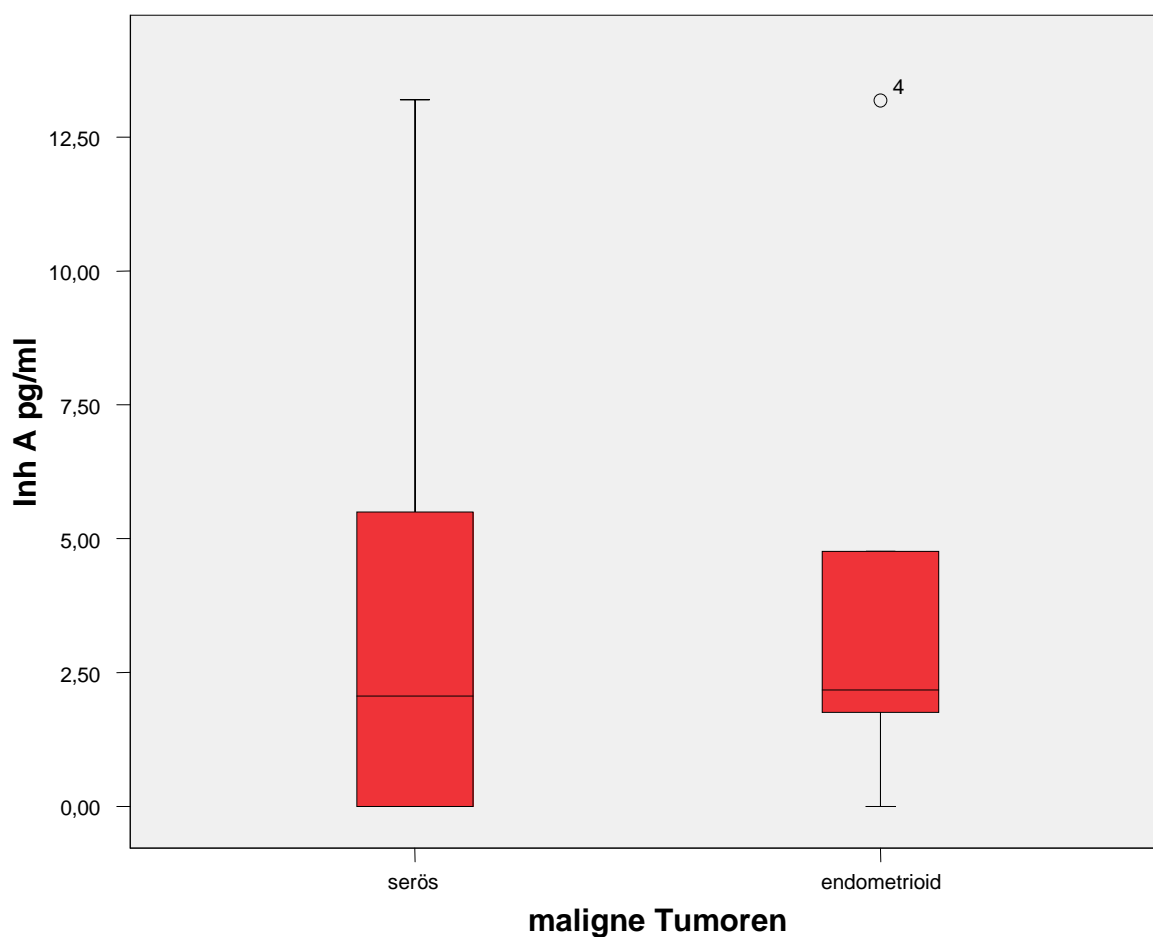


Abbildung 8. Darstellung der Serumkonzentrationen innerhalb maligner Erkrankungen

Innerhalb der Gruppe maligner Erkrankungen konnte für Inhibin A kein signifikanter Unterschied zwischen serösen und endometrioiden Tumoren gemessen werden.

	Inhibin A
Asymptotische Signifikanz	0,580

Tabelle 3. p-Wert für den Vergleich der Inhibin A-Konzentration im Serum von Patientinnen mit malignen Erkrankungen

3.1.4 Vergleich der Serumkonzentration der Aktivine im Serum von Patientinnen innerhalb der malignen Erkrankungen

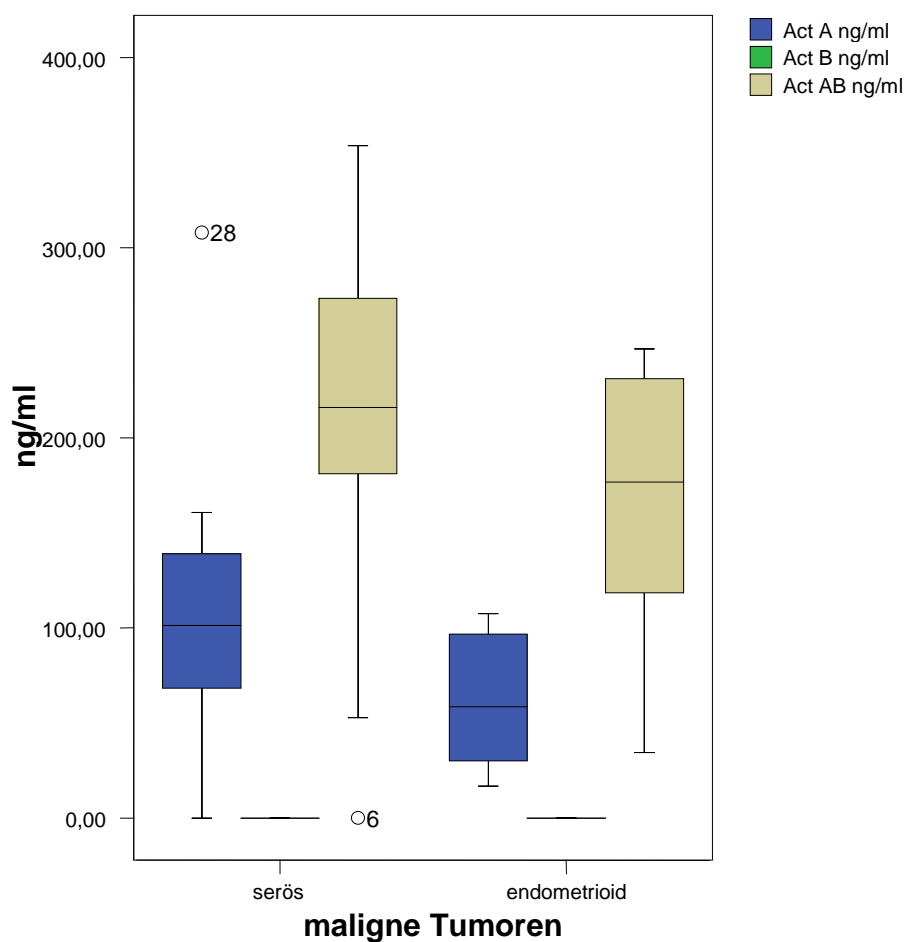


Abbildung 9. Darstellung der Aktivinsekonzentrationen innerhalb der malignen Erkrankungen

Innerhalb der Gruppe maligner Erkrankungen konnte für keine der Aktivinuntereinheiten ein signifikanter Unterschied zwischen serösen und endometrioiden Tumoren gemessen werden.

	Aktivin A	Aktivin B	Aktivin AB
Asymptotische Signifikanz	0,396	0,655	0,248

Tabelle 4. p-Werte für den Vergleich der Aktivinkonzentrationen im Serum von Patientinnen innerhalb der Gruppe der malignen Erkrankungen.

3.1.5 Vergleich der Serumkonzentration des Inhibin A im Serum von Patientinnen innerhalb der benignen Erkrankungen

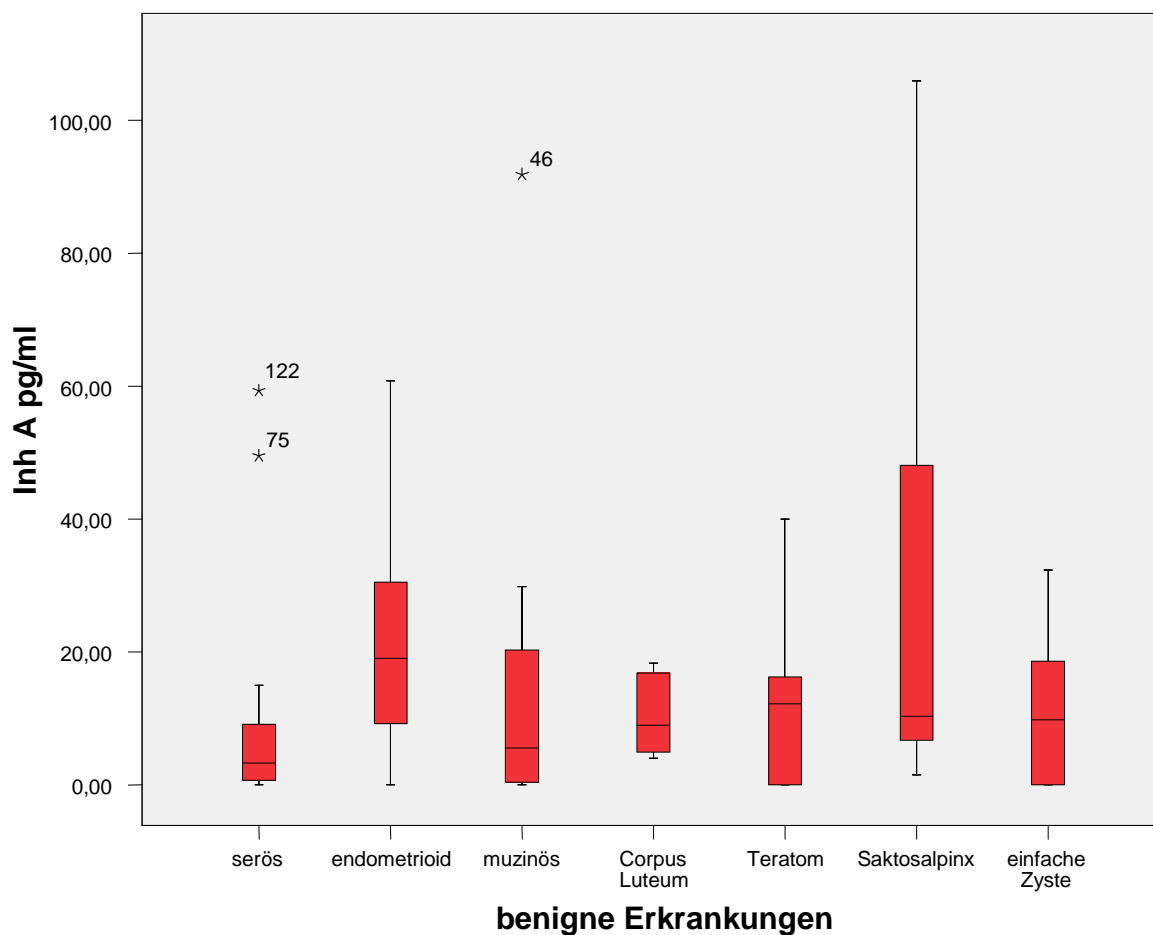


Abbildung 10. Darstellung der Serumkonzentrationen innerhalb der benignen Erkrankungen.

Innerhalb der Gruppe benigner Erkrankungen konnte für Inhibin A kein signifikanter Unterschied gemessen werden.

	Inhibin A
Asymptotische Signifikanz	0,201

Tabelle 5. p-Wert für den Vergleich der Inhibin A-Konzentration im Serum von Patientinnen innerhalb der Gruppe mit benignen Erkrankungen

3.1.6 Vergleich der Serumkonzentration der Aktivine im Serum von Patientinnen innerhalb der benignen Erkrankungen

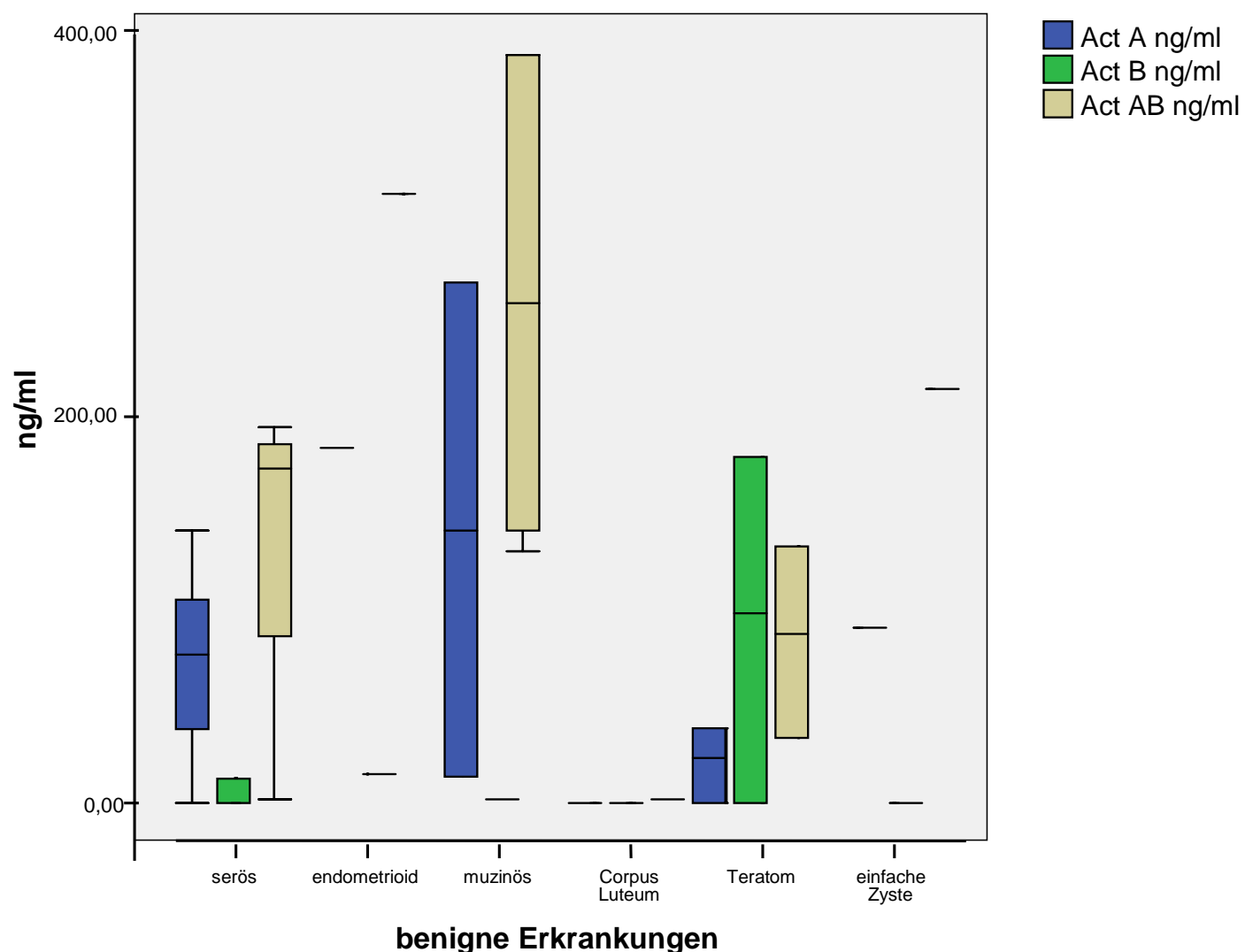


Abbildung 11. Darstellung der Serumkonzentrationen innerhalb der benignen Erkrankungen.

Die Konzentrationen der verglichenen Untereinheiten zeigten sich in der Gruppe der benignen Erkrankungen als nicht signifikant.

	Aktivin A	Aktivin B	Aktivin AB
Asymptotische Signifikanz	0,608	0,353	0,100

Tabelle 6. p-Werte für den Vergleich der Aktivinkonzentrationen im Serum von Patientinnen innerhalb der Gruppe mit benignen Erkrankungen

3.2 Immunhistochemische Analyse

3.2.1 Vergleich der Expression der Inhibin- α -Untereinheit im Gewebe von Patientinnen mit malignen und dem von Patientinnen mit benignen Erkrankungen

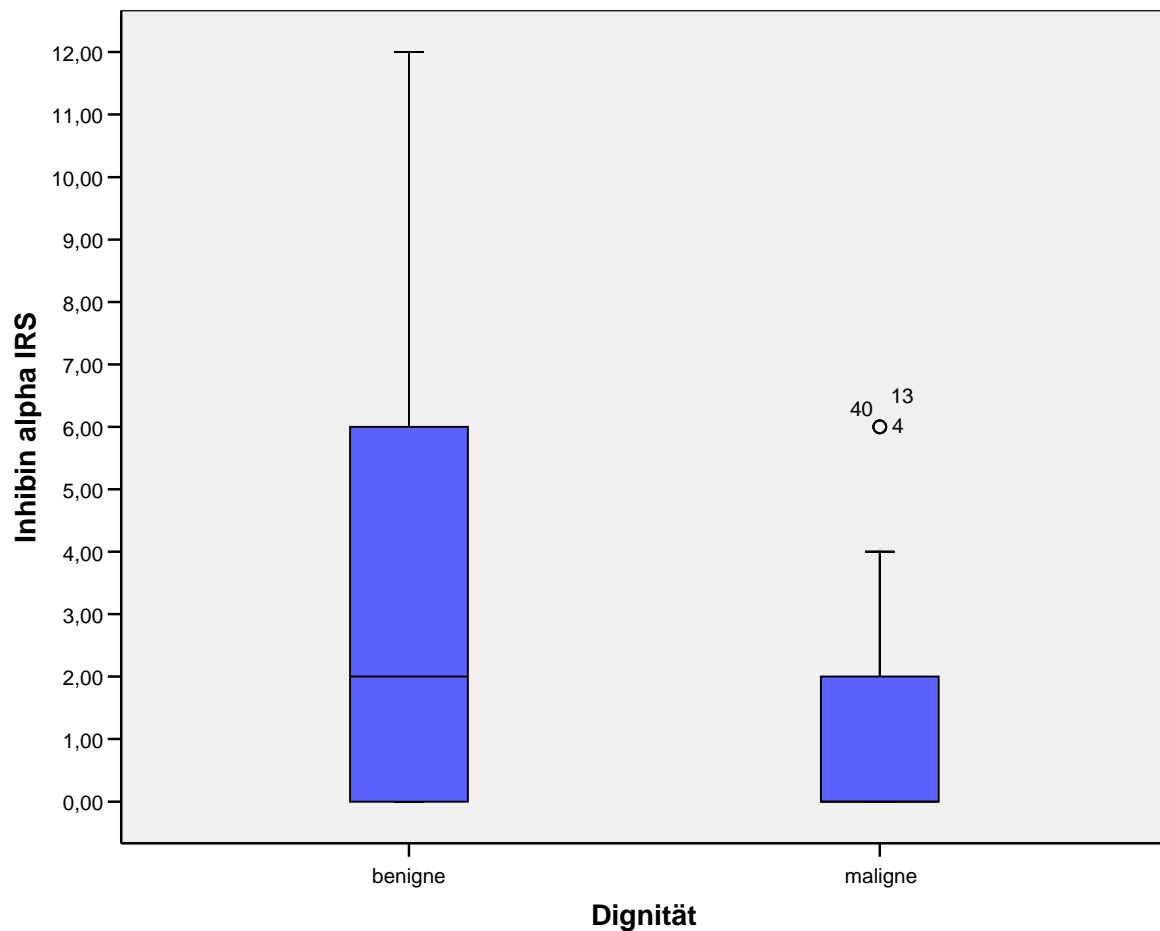


Abbildung 12. Darstellung des IRS benigner vs. maligner Erkrankungen.

Die Inhibin α -Untereinheit zeigt sich innerhalb der Gruppe der benignen Erkrankungen hoch signifikant erhöht.

	Inhibin α
Asymptotische Signifikanz	0,002

Tabelle 7. p-Wert für den Vergleich der Inhibin- α -Untereinheit im Gewebe von Patientinnen mit benignen bzw. malignen Erkrankungen.

Beispiele zur Färbeintensität:

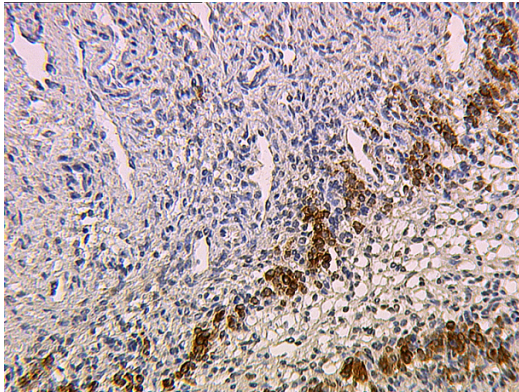


Abbildung 13:
mucinöse benigne Zyste, Inh α -Expression

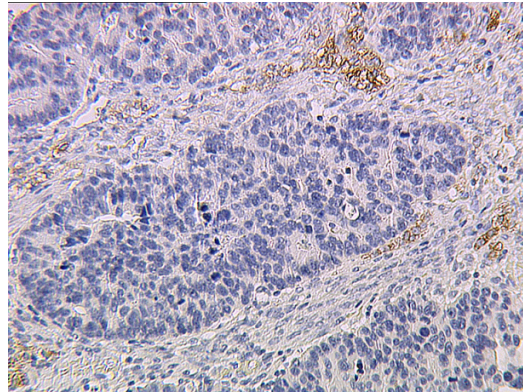


Abbildung 14:
endometrioider, maligner Tumor, Inh α -Expression;
FIGO IIc

3.2.2 Vergleich der Expression der Inhibin- β -Untereinheiten im Gewebe von Patientinnen mit malignen und dem von Patientinnen mit benignen Erkrankungen

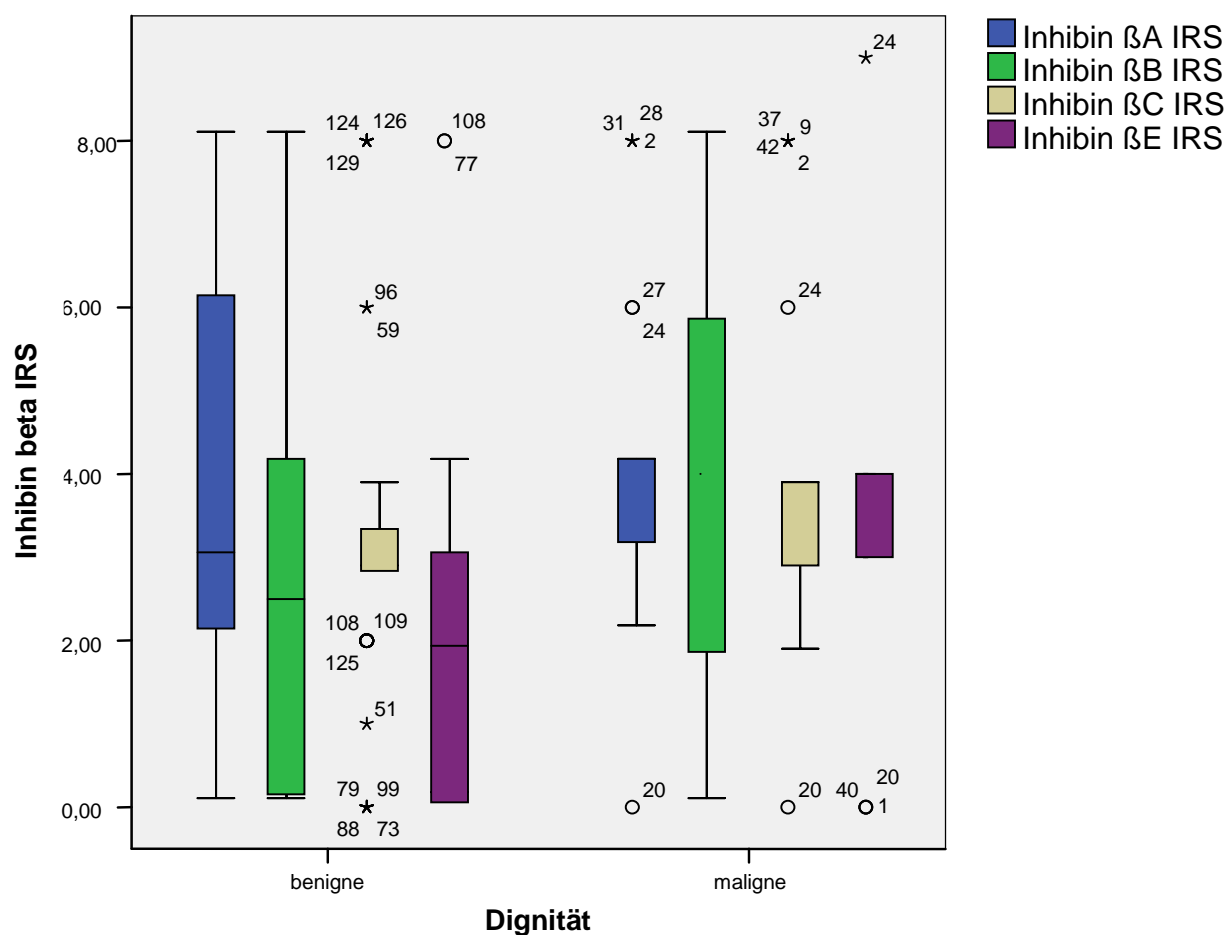


Abbildung 15. Darstellung des IRS benigner vs. maligner Erkrankungen

Die β B-Untereinheit zeigt sich in der Gruppe der malignen Erkrankungen hoch signifikant erhöht. Die Inhibin β E-Untereinheit zeigt sich in der Gruppe der malignen Erkrankungen höchst signifikant erhöht. Die anderen gemessenen Untereinheiten präsentierten nicht signifikante Ergebnisse.

	Inhibin β A	Inhibin β B	Inhibin β C	Inhibin β E
Asymptotische Signifikanz	0,755	0,002	0,055	0,000

Tabelle 8. p-Werte für den Vergleich der Inhibin- β -Untereinheiten im Gewebe von Patientinnen mit benignen bzw. malignen Erkrankungen.

Beispiele zur Färbeintensität:

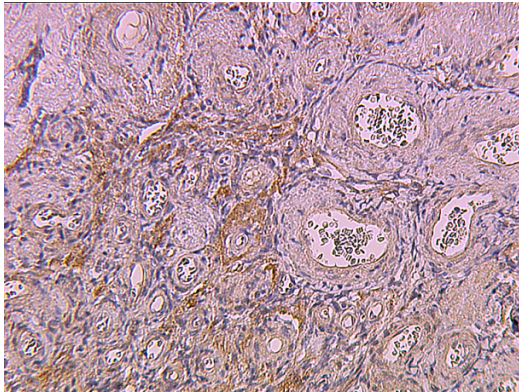


Abbildung 16:
seröse benigne Zyste, Inhibin β A-Expression

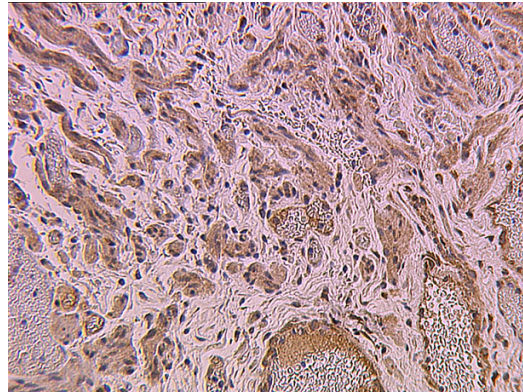


Abbildung 17:
endometrioides Karzinom, Inhibin β A-Expression;
FIGO IIc

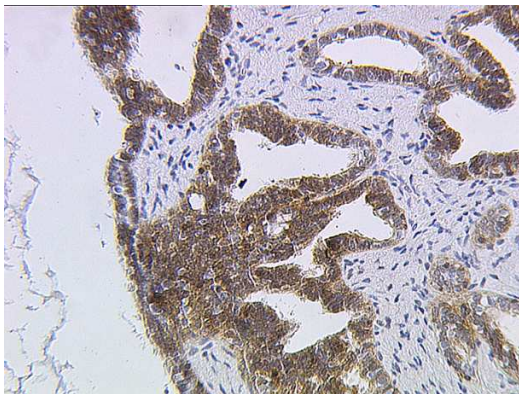


Abbildung 18:
seröse benigne Zyste, Inhibin β B-Expression

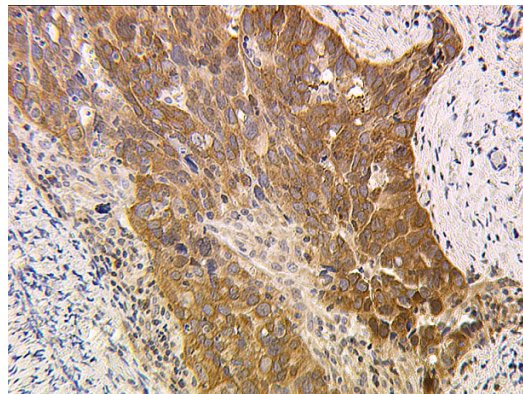


Abbildung 19:
seröses Karzinom, Inhibin β B-Expression;
FIGO Ia

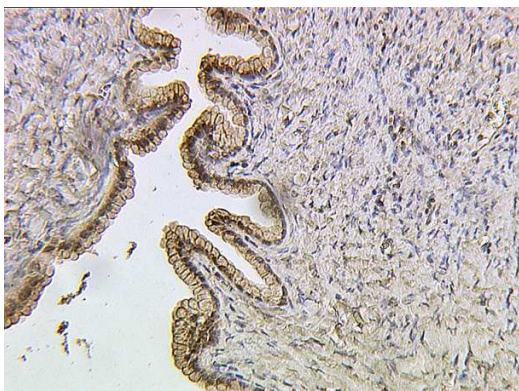


Abbildung 20:
endometrioid benigne Zyste, Inhibin β C-
Expression

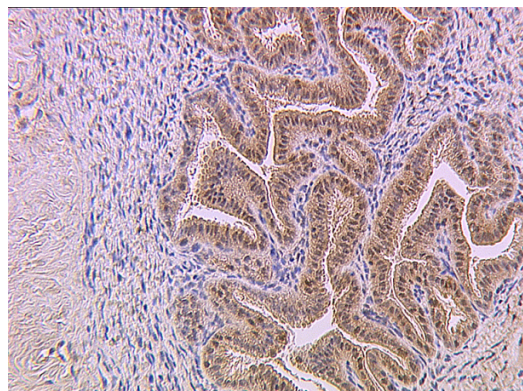


Abbildung 21:
seröses Karzinom, Inhibin β C-Expression;
FIGO IIIc

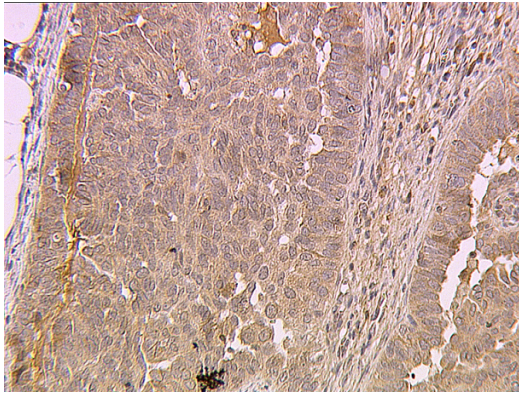


Abbildung 22:
endometrioides benigne Zyste, Inhibin β E-
Expression

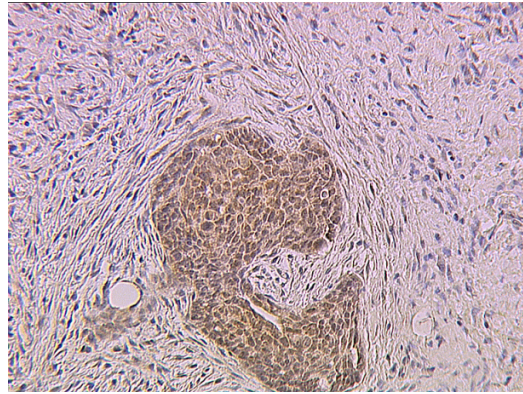


Abbildung 23:
endometrioides Karzinom, Inhibin β E-
Expression; FIGO IIc

3.2.3 Vergleich der Expression der Inhibin- α -Untereinheit im Gewebe von Patientinnen mit malignen Erkrankungen

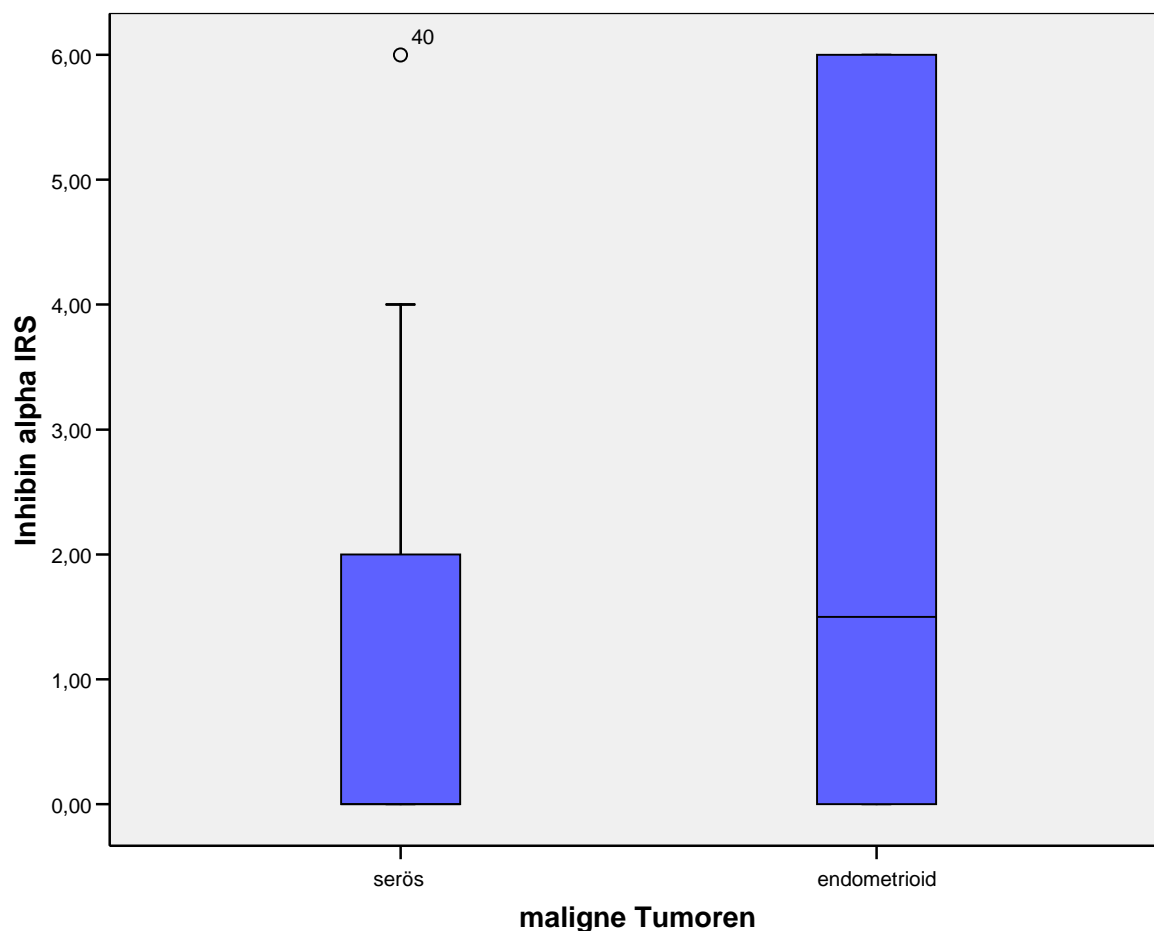


Abbildung 24. Darstellung des IRS der α -Untereinheit in der Gruppe benigner Erkrankungen.

Die Inhibin- α -Untereinheit präsentierte in der Gruppe der malignen Erkrankungen kein signifikantes Ergebnis.

	Inhibin α
Asymptotische Signifikanz	0,142

Tabelle 9. p-Wert für den Vergleich der Inhibin- α -Untereinheit im Gewebe von Patientinnen mit benignen Erkrankungen.

3.2.4 Vergleich der Expression der Inhibin β B- und β E-Untereinheiten im Gewebe von Patientinnen mit malignen Erkrankungen

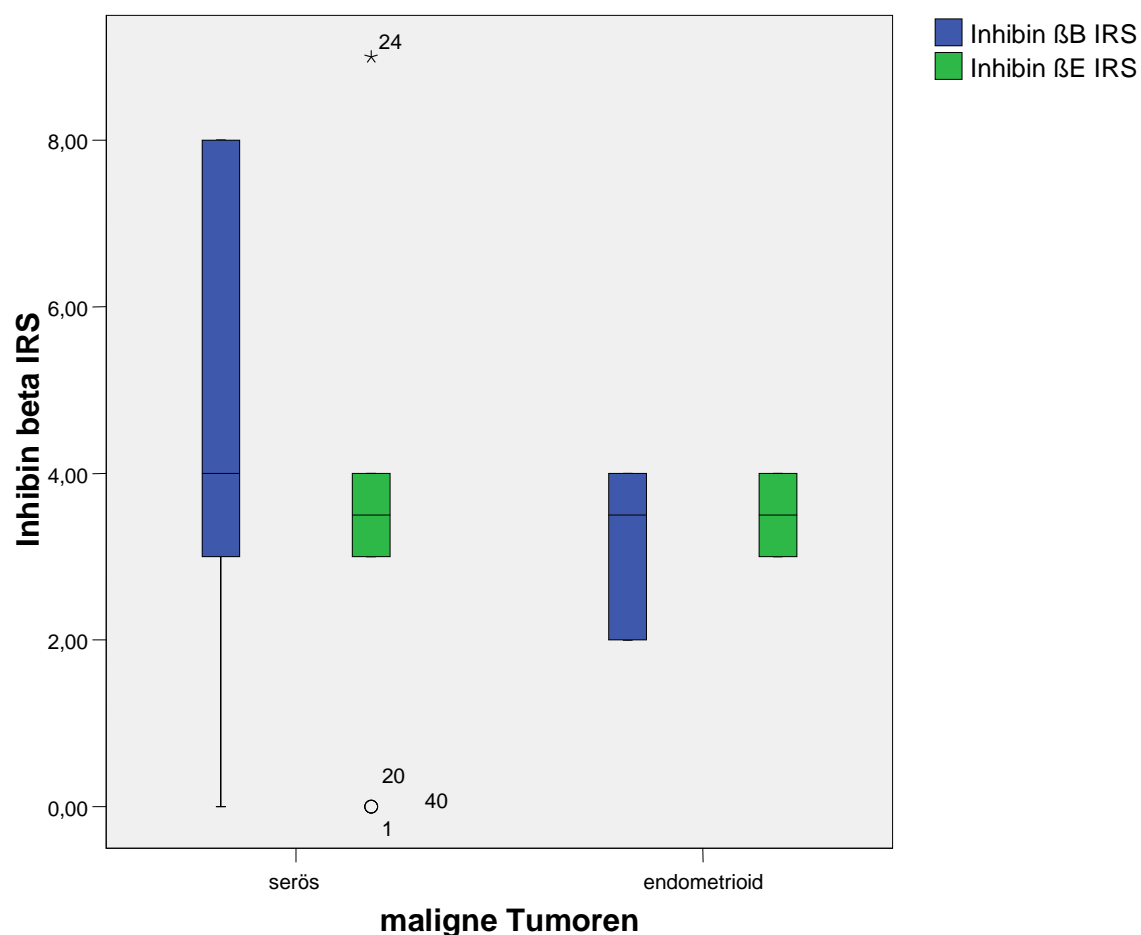


Abbildung 25. Darstellung des IRS innerhalb der malignen Erkrankungen.

Weder die Inhibin β B- noch die β E-Untereinheit zeigten in der Gruppe der malignen Erkrankungen signifikante Färbungsunterschiede.

	Inhibin β B	Inhibin β E
Asymptotische Signifikanz	0,335	0,874

Tabelle 10. p-Werte für den Vergleich der Inhibinuntereinheiten β B und β E im Gewebe der Patientinnengruppe mit malignen Erkrankungen.

3.2.5 Vergleich der Expression der Inhibin- α -Untereinheit im Gewebe von Patientinnen mit benignen Erkrankungen

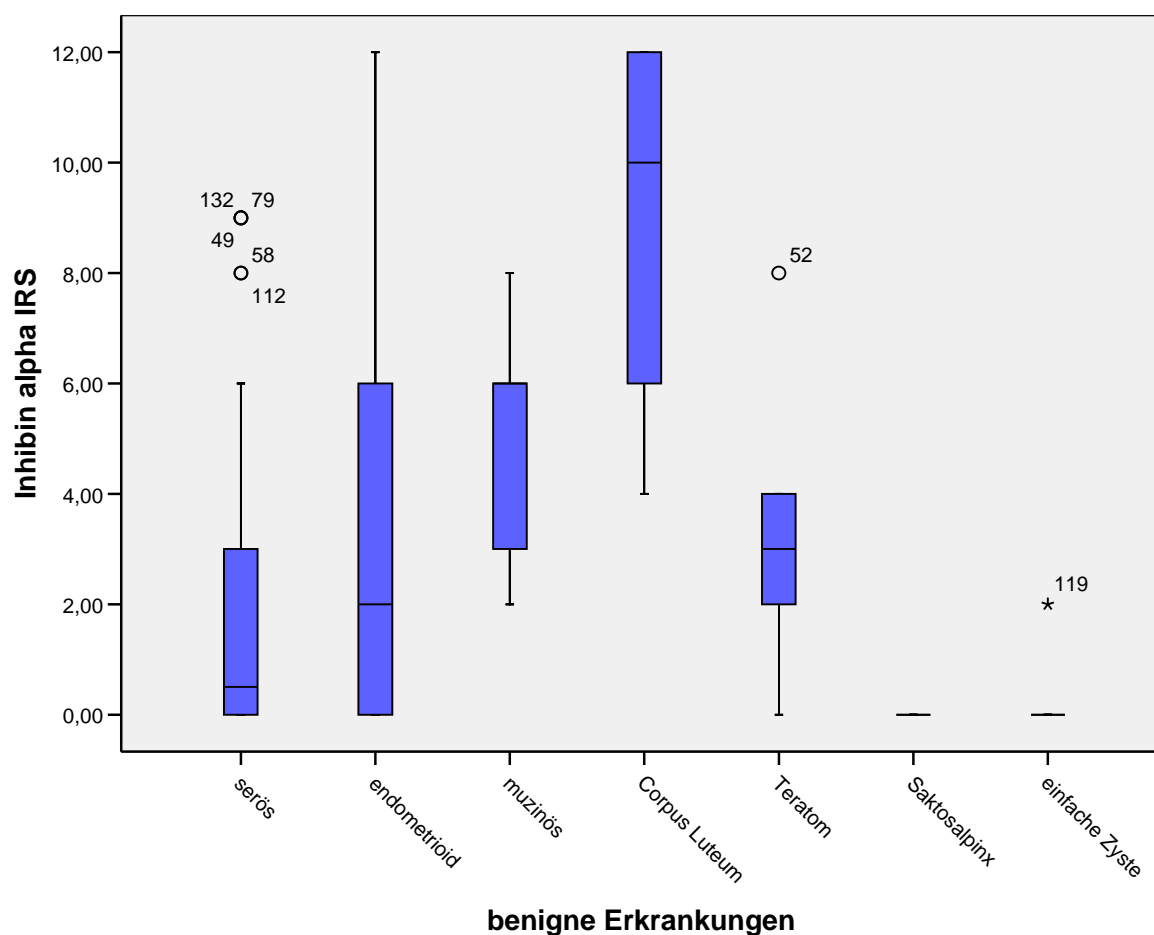


Abbildung 26. Darstellung des IRS der Inhibin α -Untereinheit innerhalb der benignen Erkrankungen.

Die Inhibin α -Untereinheit zeigt sich innerhalb der Gruppe der benignen Erkrankungen als höchst signifikant.

	Inhibin α
Asymptotische Signifikanz	0,001

Tabelle 11. p-Werte für den Vergleich der Inhibinuntereinheit α , im Gewebe der Patientinnengruppe innerhalb der benignen Erkrankungen.

3.2.6 Vergleich der Expression von Inhibin β B- und β E-Untereinheiten im Gewebe von Patientinnen innerhalb der benignen Erkrankungen

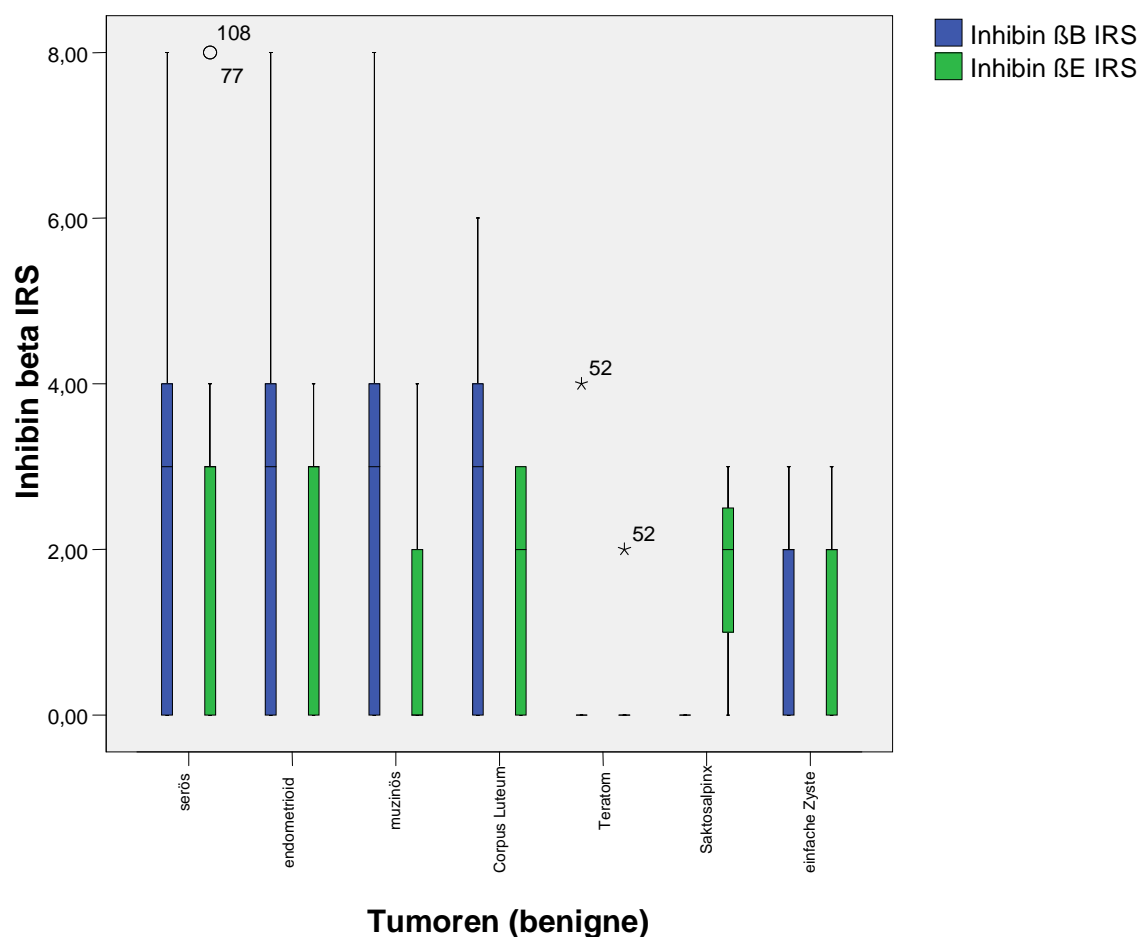


Abbildung 27. Darstellung des IRS innerhalb der benignen Erkrankungen

Weder die Inhibin β B- noch die β E-Untereinheit zeigten in der Gruppe der benignen Erkrankungen signifikante Färbungsunterschiede.

	Inhibin β B	Inhibin β E
Asymptotische Signifikanz	0,264	0,250

Tabelle 12. p-Werte für den Vergleich der Inhibinuntereinheiten β B und β E im Gewebe der Patientinnengruppe mit benignen Erkrankungen.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Serum von benigne erkrankten Patientinnen konnte eine signifikante Erhöhung der Inhibin A- sowie der Aktivin B-Konzentration gemessen werden, wohingegen die Inhibin A- bzw. Aktivin B-Werte in der Menge der an maligne erkrankten Patientinnen deutlich niedriger lagen.

Dasselbe gilt für die entsprechende Inhibin α -Untereinheit, welche in den benignen Tumoren, verglichen mit den malignen Tumoren eine signifikant ausgeprägtere Expression zeigt.

Somit gestatten diese Messungen, durch die Höhe der Konzentration der Inhibin A-Untereinheit in Serum und der entsprechend hohen Gewebeexpression der Inhibin α -Untereinheit, Rückschlüsse auf die Tumordignität zu ziehen.

Im Gegensatz dazu erfolgte der Nachweis einer signifikant höheren Expression der β B-Untereinheit und der β E-Untereinheit in malignem Gewebe mit deutlich geringerer Ausprägung in Gewebe benigner Tumoren. Hier zeigte sich keine Korrelation der Aktivin B-Menge im Serum mit der entsprechenden β B-Untereinheit in Tumorgewebe.

Die Inhibin- α -Untereinheit präsentierte in der Gruppe der malignen Erkrankungen kein signifikantes Ergebnis. Innerhalb der Gruppe maligner Erkrankungen konnte weder für Inhibin A noch eine der Aktivinuntereinheiten ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Weder die Inhibin β B- noch die β E-Untereinheit zeigten in der Gruppe der malignen Erkrankungen signifikante Färbungsunterschiede.

Weder die Inhibin β B- noch die β E-Untereinheit erbrachten in der Gruppe der benignen Erkrankungen signifikante Färbungsunterschiede. Auch für Inhibin A, Aktivin A, B, oder AB konnte hier keine signifikante Serumkonzentration erreicht werden.

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Patienten

Als Spender der Gewebe- und Serumproben wurden Patientinnen ausgewählt, die sich in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt, der Ludwig-Maximilians-Universität München aufgrund einer benignen oder malignen Erkrankung des Ovariums einer Operation unterzogen. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme bei den Patientinnen keine Gravidität bestand.

Die stetig steigenden Zahlen von Frauen, die an Tumoren der Ovarien erkranken und die Tatsache, dass bei Ovarialcarcinomen keine Frühsymptome auftreten, sich also 2/3 der Patientinnen bei der Diagnosestellung bereits im Stadium III oder IV befinden [31] unterstützen ebenso die Entscheidung, Inhibinuntereinheiten in Serum und Gewebe ein und der selben Patientin zu untersuchen, wie die Ergebnisse von Burger [17] und Lappöhn [43] et al.. Letzterer beschrieb 1989 erstmals den Zusammenhang von Serumerhöhungen der Inhibinkonzentration mit Ovarialkarzinomen.

4.2 Inhibin-/Aktivinuntereinheiten als Marker zur Differenzierung in Serum und Gewebe mit Malignität

In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl immunhistochemisch im Gewebe ein signifikanter Abfall der Inhibin- α -Expression innerhalb der malignen Erkrankungen nachgewiesen ($p = 0,002$), als auch parallel dazu ein signifikanter Abfall der Inhibin A-Sekretion im Serum derselben Patientinnen gemessen ($p = 0,001$) werden. Des Weiteren lässt die α -Ketten-Expression auch eine Aussage über die Art der benignen Ovarialerkrankungen zu ($p = 0,001$). Im Tumorgewebe kam es dagegen, besonders innerhalb der β B- ($p = 0,002$) und β E-Untereinheiten ($p = 0,000$), zwar zu einem signifikanten Anstieg der Expression dieser Untereinheiten, die Konzentration von Activin B hingegen fiel [18]. Dies bestätigt die Vorstellungen aus der Literatur, dass die Inhibin- α -Kette als Tumorsuppressor fungiert [21,41,43,58,62,67,77,90] .

Auch in tierexperimentellen Studien wurde derartiges beobachtet. So transplantierte man Ovarien drei Wochen alter transgener Mäuse, welche einen Mangel an Inhibin- α aufwiesen, immunkompatiblen Empfängerermäusen eines Wildtyps. Wurden beide gesunden Ovarien der

Empfängermaus durch die der Spendermaus ersetzt, fiel der Serum-Inhibin- α -Spiegel und die transplantierten Ovarien entwickelten Tumoren. Wurde der Spendermaus aber nur ein Ovar transplantiert und ein gesundes in situ belassen, konnten die Inhibin- α -Konzentrationen aufrechterhalten werden und es traten keine Tumoren auf [52].

Außerdem ließ sich somit der Rückschluss ziehen, dass diese Beobachtung nicht den Folgen einer Erhöhung des Aktivinspiegels zuzuschreiben sind. Vielmehr liegt das Hauptaugenmerk hierbei auf den unterschiedlichen Rollen der Mitglieder der TGF-Familie als endokrine, parakrine und autokrine Hormone in der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Da Inhibin und Aktivin, sowie deren Rezeptoren in Säugetieren, Vögeln, Amphibien und Fischen gleichermaßen entdeckt werden konnten, scheinen selbige Proteine also großen Anteil an der Entwicklung dieser Tiere zu nehmen. Matzuk et al. demonstrierten ebenfalls die Suppressionswirkung von Inhibin auf Gonaden und Nebennieren, und haben die Beteiligung von Aktivin am cancer cachexia-like syndrome vermuten lassen [53].

Auch wir fanden das β A-Dimer aus der Aktivinfamilie im Serum der an maligner Erkrankung leidenden Patientinnengruppe in höherer Konzentration, als in der benignen Vergleichskohorte. Und auch in Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen wurden von Cobellis et al. erhöhte Aktivinspiegel entdeckt. In der untersuchten Kohorte wurden zwar ähnlich hohe Aktivinspiegel bei gesunden sowie an benignen Zysten leidenden Patientinnen gemessen. Signifikante Anstiege fanden sich jedoch bei den Patientinnen mit malignen Tumoren [22].

Die benignen Gewebe unserer Studie exprimierten hingegen die Inhibinuntereinheit β A in annähernd gleichem Ausmaß wie die malignen Gewebe. Das Heterodimer Aktivin AB, zwar in den am höchsten gemessenen Konzentrationen sezerniert, zeigte jedoch keine signifikante Besonderheit in einer bestimmten Patientinnengruppe. Ebenso verhielt es sich mit der β C-Kette, und deren Expression. Auch sie war nicht signifikant. Dennoch scheint die Entwicklung von Medikamenten, welche das andocken gewisser Aktivingruppen an ihren spezifischen Rezeptor blockieren notwendig zu sein [71]. Sie sind nämlich nicht nur am Wachstum etlicher Karzinomarten beteiligt, sondern auch für die Apoptose von Hepatozyten und B-Zellen, Entzündungen, Fibrosen und Neurogenese verantwortlich, so dass von diesen Medikamenten viele Patienten profitieren könnten [84].

An humanem normalem und malignem Endometrium konnte wiederum die suppressive Wirkung der Inhibin- α -Kette von Worbs et al. [90] nachgewiesen werden. Dieses zeigte sich in signifikant abnehmender Expression von der gesunden Endometriumgruppe zur malignen Gruppe hin, was

die These von Inhibin A als Tumorsuppressor abermals unterstützt. Dass Inhibin β B in Endometriumkarzinomen im Stadium G3 stärker exprimiert werden, als im Stadium G2 legt allerdings den Verdacht nahe, dass diese Untereinheit eher an der Progression der Karzinogenese von Endometriumkarzinomen beteiligt zu sein scheint.

4.3 Zusammenhang der Inhibinuntereinheiten in Serum und Gewebe innerhalb Malignität

Innerhalb der Gruppe der malignen Tumoren, welche mangels Fallzahlen lediglich in die Gruppen seröser und endometrioider Tumoren unterteilt wurden, zeigten sich besonders die Konzentrationen von Aktivin A und Aktivin AB erhöht, in der serösen Gruppe mehr als in der endometrioiden. Mit dieser Problematik beschäftigten sich auch Chen et al. [21] und erzielten ähnliche Ergebnisse, besonders im Zusammenhang von Aktivin und Regulation der Genexpression. Wir konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied messen. Sowohl Inhibin A als auch Aktivin B waren kaum nachweisbar. Besonders zuzutreffen scheint diese Tatsache auch auf epitheliale Ovarialkarzinome. Ala-Fossi et al. konnten in genannten Geweben auch über einen indirekten Versuch mittels Polymerasekettenreaktion keine Inhibinuntereinheiten finden, diese traten nur in Stomachgewebe auf [2]. In einer weiteren Untersuchung bewiesen sie die Vermutung, dass über die Höhe der Inhibinexpression, die Prognose von Patientinnen, welche wegen Granulosazelltumoren operiert wurden, bestimmt werden kann. Bei der überwiegenden Zahl der als FIGO III und IV klassifizierten Tumoren konnte keine Expression der Inhibin- α -Kette nachgewiesen werden. Hingegen alle Tumoren der FIGO I und II Klasse exprimierten diese, das Überleben dieser Patientinnen war mit im Median 183 Monaten Länge signifikant höher, als das der Patientinnen ohne Expression der α -Untereinheit, mit einem Median von 2,5 Monaten [1].

Wir konnten für die Expression der α -Untereinheit einen ebensolchen signifikanten Nachweis erbringen ($p = 0,44$). Ihre Färbeintensität betrug in der FIGO-Klasse I und II im Median IRS 2, in der FIGO-Klasse III und IV im Median IRS 0. Mit zunehmender Malignität wird die Inhibin- α -Kette also in immer geringer werdendem Ausmaß exprimiert, was wiederum für die These als Tumorsuppressor, beziehungsweise –marker spricht.

Bei unserer immunhistochemischen Auswertung der Inhibinuntereinheiten innerhalb der malignen Kohorte, zeigte sich, dass in der serösen, ebenso wie in der endometrioiden Gruppe

eine Expression der α -, β B- und der β E-Untereinheit stattfinden, wobei die α -Kette in serösem Gewebe nur in geringen Konzentrationen gefunden wurden (bis max. IRS 4), wohingegen β B- (bis IRS 8) und β E-Ketten (IRS 3-4) im mittleren Bereich des IRS nachgewiesen werden konnten. In unserer endometrioiden Gruppe erreichte die α -Kette jedoch höhere Werte auf der IRS-Skala (bis IRS 6), β B- eher niedrige (IRS 2-4) und β E-Ketten blieben im selben Bereich wie in serösen Tumoren.

Analog zu unseren Untersuchungen konnten Yamashita et al. in serösen Tumorgeweben keine α -Ketten nachweisen, ebenso wenig in muzinösen Adenokarzinomen. Dort jedoch erlangten sie positive Färberesultate für β A- und β B-Ketten, was ihnen auch für seröse Tumorzellen gelang [92]. Diese Tatsache scheint nicht nur für Gonadenmesenchym zu gelten. Kumanov et al. konnte ebenfalls eine Immunreaktion gegen die α -Untereinheit in Adenomen und Karzinomen der Nebennierenrinde nachweisen. Ebenso erniedrigt zeigte sich die α -Kette bei malignen Prostataerkrankungen [40].

Vergleichbares dazu präsentierten Zhao et al. in ihrer vergleichenden Analyse alternativer und traditioneller immunhistochemischer Marker für die Abgrenzung ovarieller Sertolizelltumoren von endometrioiden und karzinoiden Tumoren. Sie verglichen traditionelle Tumormarker wie Pan-Cytokeratin, Cytokeratin 8 und 18, Epithelial-Membran-Antigen, Inhibin, Calretinin, CD99, Chromogranin, und Synaptophysin, welche von Fall zu Fall lediglich eingeschränkte diagnostische Möglichkeiten bieten können, mit den alternativen Markern Cytokeratin 7, Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, CD10, und CD56 und deren Vorteile bei der Tumoridentifizierung. Innerhalb der Keimstrangtumoren zeigten sich Inhibin und Calretinin als die günstigsten Tumormarker, wobei Inhibin als der charakteristischste getestet wurde [97]. Als besten Marker zur Verlaufsbeobachtung befanden Phocas et al. Inhibin im Vergleich zu CA125 und CEA, insbesondere bei muzinösen Ovarialtumoren. CA125 zeigt nur in nicht muzinösen Ovarialkarzinomen Effizienz als Tumormarker und scheitert zusammen mit CEA sogar an der Entdeckung von, sich in Frühstadien befindlicher Malignome. Außerdem weisen diese beiden eine lange Serumhalbwertszeit nach erfolgreicher Operation auf, während der Inhibinspiegel innerhalb von acht Tagen wieder Werte annahm, welche denen gesunder Patientinnen entsprechen. Phocas et al. machen sich daher für die Verwendung von Inhibin als Verlaufsparemeter jeglicher Ovarialkarzinome stark, speziell aber im Rahmen muzinöser Vertreter [62]. Dass niedrige Spiegel von Inhibin A in der Peritonealflüssigkeit von erkrankten Patientinnen mit ihren Ovarialkarzinomen assoziiert seien, und Rückschlüsse über

Maligntätsgrad und Tumorstadium zulassen könnten, zeigten Ala-Fossi et al.. In Ihrer Studie maßen sie im Serum von, an Ovarialkarzinomen leidenden Patientinnen niedrige Inhibin-A- und sehr hohe pro- α -C-Konzentrationen, welche von den Inhibinspiegeln in der intraoperativ gewonnenen Peritonealflüssigkeit bei weitem übertroffen wurden. Sie erbrachten so Hinweise, dass verhältnismäßig niedrige Inhibin-A- und Inhibin-pro- α -C-Konzentrationen in der Peritonealflüssigkeit mit vorangeschrittenem Tumorstadium und –grading assoziiert sind und, in einem geringeren Grade ein Zusammenhang mit positiver peritonealer Zytologie bestehen könnte [3].

Auch Worbs et al. stellten kürzlich den hohen Nutzen der Inhibinuntereinheiten als Tumormarker, und die Wirkung der α -Kette als Suppressor im Rahmen der Karzinogenese fest. Endometriumkarzinome im G3-Stadium exprimierten nämlich die α -Untereinheit überhaupt nicht, wohingegen sich für Inhibin β A und β B spezifische Färbereaktionen innerhalb der einzelnen Gewebe nachweisen ließen. So wurde in normalem Endometrium die vergleichsweise höchste Menge an Inhibin β A-Ketten gemessen, in den Adenokarzinomen die niedrigste. Die höchste Expressionsrate von Inhibin β B wurde in Endometriumkarzinomen im G3 Stadium beobachtet, wohingegen G2-Tumoren und atrophisches Endometrium so gut wie kein Inhibin β B exprimieren [90].

In der Dermatologie finden sich ebenfalls Hinweise, dass niedrige Inhibinspiegel Tumoren zu begünstigen scheinen. Die Haut betreffende, in mehrere Untergruppen klassifizierte Granulosazelltumoren exprimierten wiederum zu 100% Calretinin und Inhibin. Andere immunhistochemisch getestete Substanzen wie S100, NSE und Melan-A färbten das Tumorgewebe kaum oder gar nicht an. Somit trägt Inhibin hier ebenfalls zur Unterscheidung von Tumorklassen bei [63].

4.4 Zusammenhang der Inhibinuntereinheiten in Serum und Gewebe mit Benignität

Die Gruppe der benignen Erkrankungen klassifizierten wir nach Pathologie in sieben Kategorien. Im Serum ließen sich zwar keine signifikanten Messungen erzielen, es fiel jedoch auf, dass die Aktivin AB-Heterodimere in serösen, endometrioiden, muzinösen und einfachen Zysten eine deutlich höhere Konzentration aufwiesen, als die anderen Mitglieder dieser TGF-Familie. Auch Yamashita et al. beobachteten eine starke spezifische immunhistochemische Färbereaktion für die

α -, β A- und β B-Untereinheiten in den Ovarialzellen muzinöser Adenome und zystischer Tumoren mit Borderlinemalignität. Die Vermutung liegt daher nahe, dass zwar sowohl α - als auch β -Ketten von diesen Geweben exprimiert werden, die Sekretion maligner Zellen aber überwiegend für Aktivin, also die β -Untereinheit erfolgt [92].

Die unter die benignen, nur fakultativ bösartigen, Keimstrangstromatumoren subsummierten Granulosa- und Sertoli-Leydig-Zelltumoren wurden von Yamashita et al. ebenfalls auf Expression sowie Sekretion der Inhibindimere A und B untersucht. Sie fanden heraus, dass sowohl die α - wie auch die β -Fraktionen in den nur zu 30% maligne entartenden Granulosazelltumoren exprimiert werden. Eine spezifische Färbereaktion für Leydigtumorzellen beobachteten sie für die α -Untereinheit, in den Sertolitumorzellen die spezifische Färbereaktion für die β A-Kette. Die β B-Subunit wiesen sie für beide Zellklassen nach. Korrespondierend dazu waren die Serumspiegel der Inhibin A- und B-Dimere präoperativ stark erhöht, fielen aber nach der operativen Entfernung der Neubildungen wieder auf normale Werte ab [91]. Die Vermutung liegt daher auch hier nahe, dass die α -Untereinheit in benignen Geweben als Tumorsuppressor fungiert und eine maligne Entartung zu verhindern scheint.

Wir konnten, für die von uns miteinander verglichenen benignen Erkrankungen des Ovars, eine höchst signifikante ($p < 0,001$) immunhistochemische Färbungsverteilung für die Inhibin- α -Untereinheit feststellen. Die als einfache Zysten und als Saktosalpinx klassifizierten benignen Ovarialveränderungen zeigten keinerlei Färbereaktion. Die serösen (IRS median <1) und endometrioiden (IRS median 2) Zysten sowie die Teratome (IRS median 3) lagen im mittleren Färbereich. Die höchste Expression der α -Untereinheit stellten wir innerhalb der Corpus Luteum (IRS median 10) und der muzinösen Zysten (IRS median 6) fest. Anhand der Färbereaktion bzw. der α -Ketten-Expression lässt sich also sowohl eine Aussage über die Dignität als auch die Art der benignen Ovarialerkrankungen treffen. Die Färbereaktion der β -Ketten erlaubten zwar, wie erwähnt eine Differenzierung der Dignität, brachten aber kein signifikantes Ergebnis in der Klassifizierung innerhalb der benignen Testgruppe. Offensichtlich gibt es also nicht nur einen Zusammenhang zwischen Vorkommen von Inhibinuntereinheiten und dem Auftreten maligner Gewebismetaplasien, sondern auch eine Beziehung zur Bildung benigner Gewebedysplasien.

Ebenso wie wir, folgerten Yamashita et al. aus ihren Resultaten einen wertvollen Nutzen von Inhibinen als Tumormarker [91]. Den Zusammenhang zwischen Aktivin und epithelialen Ovarialtumoren verdeutlichen die Ergebnisse von Mangioni et al.. Sie entdeckten, dass die TNF-

α -Sekretion in Anwesenheit von Aktivin A in endometrioiden Stromazellen einen signifikanten Anstieg erfuhr. TNF- α reguliert physiologischerweise verschiedenste Prozesse wie Menstruation, Proliferation, Implantation und Dezidualisation über das ICAM-1-System. Die getesteten Inhibin A und Aktivin A beeinflussten zwar nicht die Expression der ICAM-1-Moleküle auf der Zelloberfläche. Offensichtlich trägt aber Aktivin zur TNF- α -Sekretion bei, was über diesen indirekten Weg eine gewisse Tumorprotektivität bewirkt [49].

Einen beachtlichen Unterschied in der Expression der β B-Untereinheit stellten Salmenkivi et al. zwischen benignen und malignen Phäochromozytomen fest. Die überwiegende Mehrzahl der benignen Nebennierentumoren wies eine mittlere bis starke immunhistochemische Färbung auf, wohingegen alle untersuchten malignen Vertreter kaum oder gar nicht auf die β B-Ketten-Markierung ansprachen. Daraus schlossen auch Salmenkivi et al., dass die Inhibinuntereinheit als Marker für das maligne Potential von Phäochromozytomen von Nutzen sei [72].

Einen ähnlichen Effekt haben TGF- β 1 und Aktivin A auf maligne Thyrozyten. Sie sind die wichtigsten Wachstumsinhibitoren follikulärer epithelialer Schilddrüsenzellen des menschlichen Körpers. Einerseits wiesen die malignen Zellen Resistenzen gegen die beiden Peptide auf, andererseits fand sich auch eine Verringerung einer Isoform des Aktivinrezeptors, im Vergleich zu gesunden Schilddrüsen [74]. Auch dieses Ergebnis spricht einmal mehr für die Verwendung von Inhibindimeren beziehungsweise deren Untereinheiten als Tumormarker, deren weitere Etablierung die vorliegende Arbeit zum Ziel hatte.

5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist, mit zurzeit 4,8% und steigender Tendenz, die fünfthäufigste aller bösartigen Neubildungen bei Frauen, wovon sich, aufgrund mangelnder Früherkennungsmethoden und spät einsetzender, relativ unspezifischer Symptomatik, etwa 2/3 der Erkrankten bei der Diagnosestellung bereits im Stadium III oder IV befinden. Die Prognose ist mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 41% vergleichsweise schlecht.

Inhibin und Aktivin sind nicht-steroidale, dimere Polypeptidhormone aus der Superfamilie der TGF- β -Spezies der Cytokine. Von den Gonaden produziert, spielen Inhibine eine anerkannte, hemmende (lat. inhibere) Rolle in der Regulation der hypophysären FSH-Produktion, was bereits 1932 von McCullagh bewiesen wurde. Diese Heterodimere bestehen aus einer α - und einer, von bisher fünf bekannten, per Disulfidbrückenbindung miteinander verbundenen und namensgebenden β -Untereinheit. Aktivine sind lediglich aus den β -Untereinheiten zusammengesetzte Homo- oder Heterodimere, die auch von verschiedensten, nicht reproduktiven Geweben wie Leber, Knochen und Blutgefäßen gebildet werden.

Fragestellung der vorliegenden Untersuchung war, ob signifikante Unterschiede in der Gewebe-Expression der Inhibin- α - und β -Untereinheiten im Vergleich benigner mit malignen Erkrankungen zu erwarten, und welche davon entsprechend im Serum nachweisbar sind.

In der Studie untersucht, wurde die Expression der Inhibin-Untereinheiten α , β A, β B, β C, β E im Gewebe mittels Immunhistochemie. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Serumkonzentrationen von Inhibin A, Aktivin A, Aktivin B und Aktivin AB durch ELISA innerhalb derselben Patientinnengruppe.

Das im ELISA verwendete Serum stammte aus Blutentnahmen von 144, zwischen 1921 und 1983 geborenen, nicht-graviden Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt, der Ludwig-Maximilians-Universität München, welche sich aufgrund maligner und benigner Erkrankungen des Ovars, in den Jahren 2003 bis 2005 in stationärer Behandlung befanden. Das denselben Patientinnen intraoperativ entnommene Material, wurde nach immunhistochemischer Aufarbeitung mittels des Immunreaktiven Scores (IRS) von Remmele und Stegner beurteilt.

Im Vergleich zu den benignen Erkrankungen wurde von uns mittels ELISA ein höchst signifikanter Abfall der Inhibin A-Sekretion im Serum ($p = 0,001$) bestimmt, sowie

immunhistochemisch im Gewebe ein ebenso höchst signifikanter Abfall der Inhibin- α -Expression ($p = 0,002$) der malignen Erkrankungen nachgewiesen, wohingegen für die β B- ($p = 0,002$) und β E-Untereinheiten ($p = 0,000$) ein Anstieg verzeichnet wurde. Parallel dazu konnten wir im Serum einen signifikanten Abfall von Aktivin B ($p = 0,015$) messen.

Aber nicht nur über die Dignität, auch über die Art der untersuchten benignen Erkrankungen konnte über die α -Ketten-Expression eine signifikante Aussage ($p = 0,001$) getroffen werden.

Mit zunehmender Malignität wird die Inhibin- α -Kette also in immer geringer werdendem Ausmaß exprimiert, was für die These als Tumorsuppressor, beziehungsweise Tumormarker spricht und durch den von uns erbrachten signifikanten Nachweis der Inhibin- α -Untereinheit in Tumoren der FIGO-Klasse I und II, nicht aber in FIGO-Klasse III und IV ($p = 0,044$) gestützt wird.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse vermuten wir daher, dass die Bildung von Hetero-Dimeren bevorzugt vor der Bildung von Homodimeren der Aktivine auftritt.

.

6 Literaturnachweis

- [1] Ala-Fossi, S.L., Aine, R., Punnonen, R. and Maenpaa, J. (2000) Is potential to produce inhibins related to prognosis in ovarian granulosa cell tumors? *Eur J Gynaecol Oncol* 21, 187-9.
- [2] Ala-Fossi, S.L., Grenman, S., Zhang, F.P., Blauer, M., Punnonen, R. and Maenpaa, J. (1999) Ovarian cancer and gonadotropins in vitro: new evidence in favor of independence. *Anticancer Res* 19, 4289-95.
- [3] Ala-Fossi, S.L., Maenpaa, J., Blauer, M., Tuohimaa, P. and Punnonen, R. (2000) Inhibin A, B and pro-alphaC in serum and peritoneal fluid in postmenopausal patients with ovarian tumors. *Eur J Endocrinol* 142, 334-9.
- [4] Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F.M., Massague, J. and Wrana, J.L. (1993) Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75, 671-80.
- [5] Attisano L, W.J., Cheifetz S, Massague J (1992) Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* 68, 97-108.
- [6] Attisano, L. and Wrana, J.L. (1996) Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 327-39.
- [7] Ball, E.M., Mellor, S.L. and Risbridger, G.P. (2004) Cancer progression: is inhibin alpha from Venus or Mars? *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 291-6.
- [8] Ball, E.M. and Risbridger, G.P. (2001) Activins as regulators of branching morphogenesis. *Dev Biol* 238, 1-12.
- [9] Bergada, I., Bergada, C. and Campo, S. (2001) Role of inhibins in childhood and puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14, 343-53.

- [10] Bernard, D.J., Chapman, S.C. and Woodruff, T.K. (2001) An emerging role for co-receptors in inhibin signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 180, 55-62.
- [11] Bernard, D.J., Chapman, S.C. and Woodruff, T.K. (2002) Inhibin binding protein (InhBP/p120), betaglycan, and the continuing search for the inhibin receptor. *Mol Endocrinol* 16, 207-12.
- [12] Bogges JF, S.M., Goff BA, Greer BE, Cain JM, Tamimi HK (1997) Serum inhibin and diseases status in women with ovarian granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol*, 64-69.
- [13] Braly, P.S. and Klevecz, R.R. (1993) Flow cytometric evaluation of ovarian cancer. *Cancer* 71, 1621-8.
- [14] Braun, S., Schindlbeck, C., Hepp, F., Janni, W., Kentenich, C., Riethmuller, G. and Pantel, K. (2001) Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin Oncol* 19, 368-75.
- [15] Bühling KJ, L.J., Witt K (2000) *Allgemeine und spezielle Pathologie*.
- [16] Burger CW, P.H., Baak JP, Wagenaar N, Kenemans P. (2000 May) The management of borderline epithelial tumors of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* 10, 181-197.
- [17] Burger, H.G., Baillie, A., Drummond, A.E., Healy, D.L., Jobling, T., Mamers, P., Robertson, D.M., Susil, B., Cahir, N., Shen, Y., Verity, K., Fuller, P.J., Groome, N.P. and Findlay, J.K. (1998) Inhibin and ovarian cancer. *J Reprod Immunol* 39, 77-87.
- [18] Butler, C.M., Gold, E.J. and Risbridger, G.P. (2005) Should activin betaC be more than a fading snapshot in the activin/TGFbeta family album? *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 377-85.
- [19] Carcamo, J., Weis, F.M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J.L., Attisano, L. and Massague, J. (1994) Type I receptors specify growth-inhibitory and

- transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 14, 3810-21.
- [20] Chang, H., Lau, A.L. and Matzuk, M.M. (2001) Studying TGF-beta superfamily signaling by knockouts and knockins. *Mol Cell Endocrinol* 180, 39-46.
- [21] Chen, Y.G., Wang, Q., Lin, S.L., Chang, C.D., Chung, J. and Ying, S.Y. (2006) Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 534-44.
- [22] Cobellis, L., Reis, F.M., Luisi, S., Danero, S., Pirtoli, L., Scambia, G. and Petraglia, F. (2004) High concentrations of activin A in the peritoneal fluid of women with epithelial ovarian cancer. *J Soc Gynecol Investig* 11, 203-6.
- [23] Fang, J., Wang, S.Q., Smiley, E. and Bonadio, J. (1997) Genes coding for mouse activin beta C and beta E are closely linked and exhibit a liver-specific expression pattern in adult tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 655-61.
- [24] Florio, P., Gazzolo, D., Luisi, S. and Petraglia, F. (2007) Activin A in brain injury. *Adv Clin Chem* 43, 117-30.
- [25] Fuller, P.J., Chu, S., Fikret, S. and Burger, H.G. (2002) Molecular pathogenesis of granulosa cell tumours. *Mol Cell Endocrinol* 191, 89-96.
- [26] Fuller, P.J., Zumpe, E.T., Chu, S., Mamers, P. and Burger, H.G. (2002) Inhibin-activin receptor subunit gene expression in ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1395-401.
- [27] Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, e.V. (2006) Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 5.
- [28] Gonzalez-Manchon, C. and Vale, W. (1989) Activin-A, inhibin and transforming growth factor-beta modulate growth of two gonadal cell lines. *Endocrinology* 125, 1666-72.
- [29] Groome, N. and O'Brien, M. (1993) Immunoassays for inhibin and its subunits. Further applications of the synthetic peptide approach. *J Immunol Methods* 165, 167-76.

- [30] Gurusinghe, C.J., Healy, D.L., Jobling, T., Mamers, P. and Burger, H.G. (1995) Inhibin and activin are demonstrable by immunohistochemistry in ovarian tumor tissue. *Gynecol Oncol* 57, 27-32.
- [31] Haag P, H.N., Müller M (2005/2006) *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*.
- [32] Halvorson LM, D.A. (1996) Inhibin, activin, and follistatin in reproductive medicine. *Fertil Steril* 65, 459-69.
- [33] Hamada, T., Watanabe, G., Kokuho, T., Taya, K., Sasamoto, S., Hasegawa, Y., Miyamoto, K. and Igarashi, M. (1989) Radioimmunoassay of inhibin in various mammals. *J Endocrinol* 122, 697-704.
- [34] Harrison, C.A., Gray, P.C., Vale, W.W. and Robertson, D.M. (2005) Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol Metab* 16, 73-8.
- [35] Hubner, G., Alzheimer, C. and Werner, S. (1999) Activin: a novel player in tissue repair processes. *Histol Histopathol* 14, 295-304.
- [36] Kennedy AW, M.M., Biscotti CV (1999) Survival probability in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 74, 108-114.
- [37] Kingsley, D.M. (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8, 133-46.
- [38] Kipp, J.L., Kilen, S.M., Bristol-Gould, S., Woodruff, T.K. and Mayo, K.E. (2007) Neonatal Exposure to Estrogens Suppresses Activin Expression and Signaling in the Mouse Ovary. *Endocrinology*.
- [39] Kumanov, P., Nandipati, K., Tomova, A. and Agarwal, A. (2006) Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility. *Fertil Steril* 86, 332-8.

-
- [40] Kumanov, P., Nandipati, K.C., Tomova, A., Robeva, R. and Agarwal, A. (2005) Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod Biomed Online* 10, 786-812.
- [41] Lambert-Messerlian GM, S.M., ZhengW, Caick JA, Gajewski and WH, S.D., Schneyer AL (1997) Multiple immunoreactive inhibin proteins in serum from postmenopausal women with epithelial ovarian cancer. *Gyn Oncol*, 512–516.
- [42] Lambert-Messerlian GM, S.M., ZhengW, Caick JA, Gajewski and WH, S.D., Schneyer AL (1997) Multiple immunoreactive inhibin proteins in serum from postmenopausal women with epithelial ovarian cancer. *Gyn Oncol*, 512–516.
- [43] Lappohn RE, B.H., Bouma J, Bangah M, Krans M, de Bruijn HW (1989 Sep 21) Inhibin as a marker for granulosa-cell tumors. *N Engl J Med*. 321, 826-7.
- [44] Lau, A.L., Kumar, T.R., Nishimori, K., Bonadio, J. and Matzuk, M.M. (2000) Activin betaC and betaE genes are not essential for mouse liver growth, differentiation, and regeneration. *Mol Cell Biol* 20, 6127-37.
- [45] Lin CR, K.C., O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG (1999) Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401, 279-82.
- [46] Ling N, Y.S., Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R (1986) A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 138, 1129-37.
- [47] Lippert, H. (2000) *Lehrbuch Anatomie*. 368-378.
- [48] Liu QY, N.B., Gomes P, Gomm JJ, Davies D, Coombes RC, Buluwela L (1996) Inhibitory effects of activin on the growth and morphogenesis of primary and transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 56, 1155-63.
- [49] Mangioni, S., Vigano, P., Florio, P., Borghi, O., Vignali, M., Petraglia, F. and Di Blasio, A.M. (2005) Effect of activin A on tumor necrosis factor- α /intercellular adhesion molecule-1 pathway in endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 123, 218-23.

- [50] Massague, J. (1996) TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85, 947-50.
- [51] Matsuzaki K, X.J., Wang F, McKeehan WL, Krummen L, Kan M (1993) A widely expressed transmembrane serine/threonine kinase that does not bind activin, inhibin, transforming growth factor beta, or bone morphogenic factor. *J Biol Chem* 268, 12719-23.
- [52] Matzuk, M.M., Finegold, M.J., Su, J.G., Hsueh, A.J. and Bradley, A. (1992) Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360, 313-9.
- [53] Matzuk, M.M., Kumar, T.R., Shou, W., Coerver, K.A., Lau, A.L., Behringer, R.R. and Finegold, M.J. (1996) Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. *Recent Prog Horm Res* 51, 123-54; discussion 155-7.
- [54] Mayr, D. and Diebold, J. (2000) Grading of ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 19, 348-53.
- [55] McCullagh, D. (1932) Dual endocrine activity of the testis. *Science*, 19-20.
- [56] Meng, C., Shi, F., Zhou, Z., Huang, R., Liu, G., Watanabe, G. and Taya, K. (2006) Cellular Localization of Inhibin alpha-subunit, PKB/Akt and FoxO3a Proteins in the Ovaries of Minipigs. *J Reprod Dev*.
- [57] Mottram JC, C.W. (1923) On the general effects of exposure to radium on metabolism and tumor growth in the rat and the special effects on the testis and pituitary. *Quart J Exp Physiol* 13, 209-222.
- [58] Mylonas, I., Makovitzky, J., Hoeing, A., Richter, D.U., Vogl, J., Schulze, S., Jeschke, U., Briese, V. and Friese, K. (2006) Inhibin/activin subunits beta-A (-betaA) and beta-B (-betaB) are differentially localised in normal, hyperplastic and malignant human endometrial tissue. *Acta Histochem* 108, 1-11.
- [59] Perrien, D.S., Akel, N.S., Edwards, P.K., Carver, A.A., Bendre, M.S., Swain, F.L., Skinner, R.A., Hogue, W.R., Nicks, K.M., Pierson, T.M., Suva, L.J. and

- Gaddy, D. (2006) Inhibin A is an Endocrine Stimulator of Bone Mass and Strength. *Endocrinology*.
- [60] Pflaiderer, A. (1996) Spezielle gynäkologische Onkologie. 1-109.
- [61] Pflaiderer A, M.G. (2003) Malignome des Ovars. 4, 5-44.
- [62] Phocas, I., Sarandakou, A., Sikiotis, K., Rizos, D., Kalambokis, D. and Zourlas, P.A. (1996) A comparative study of serum alpha-beta A immunoreactive inhibin and tumor-associated antigens CA125 and CEA in ovarian cancer. *Anticancer Res* 16, 3827-31.
- [63] Ray, S. and Jukic, D.M. (2007) Cutaneous granular cell tumor with epidermal involvement: a potential mimic of melanocytic neoplasia. *J Cutan Pathol* 34, 188-94.
- [64] Remmele W, S.H. (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA). *Pathologie* 8, 138-40.
- [65] Risbridger, G.P., Robertson, D.M. and de Kretser, D.M. (1990) Current perspectives of inhibin biology. *Acta Endocrinol (Copenh)* 122, 673-82.
- [66] Risbridger, G.P., Schmitt, J.F. and Robertson, D.M. (2001) Activins and inhibins in endocrine and other tumors. *Endocr Rev* 22, 836-58.
- [67] Robertson, D.M., Burger, H.G. and Fuller, P.J. (2004) Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* 11, 35-49.
- [68] Robertson, D.M., Cahir, N., Burger, H.G., Mamers, P. and Groome, N. (1999) Inhibin forms in serum from postmenopausal women with ovarian cancers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50, 381-6.
- [69] Robertson, D.M., Pruysers, E., Burger, H.G., Jobling, T., McNeilage, J. and Healy, D. (2004) Inhibins and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 225, 65-71.
- [70] Robertson, D.M., Stephenson, T., Pruysers, E., Burger, H.G., McCloud, P., Tsigos, A., Groome, N., Mamers, P., McNeilage, J., Jobling, T. and Healy, D.

- (2002) Inhibins/activins as diagnostic markers for ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 191, 97-103.
- [71] Rodgarkia-Dara, C., Vejda, S., Erlach, N., Losert, A., Bursch, W., Berger, W., Schulte-Hermann, R. and Grusch, M. (2006) The activin axis in liver biology and disease. *Mutat Res* 613, 123-37.
- [72] Salmenkivi, K., Arola, J., Voutilainen, R., Ilvesmaki, V., Haglund, C., Kahri, A.I., Heikkila, P. and Liu, J. (2001) Inhibin/activin betaB-subunit expression in pheochromocytomas favors benign diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2231-5.
- [73] Schindlbeck, C., Jeschke, U., Schulze, S., Karsten, U., Janni, W., Rack, B., Sommer, H. and Friese, K. (2005) Characterisation of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich tumor antigen. *Histochem Cell Biol* 123, 631-7.
- [74] Schulte, K.M., Jonas, C., Krebs, R. and Roher, H.D. (2001) Activin A and activin receptors in thyroid cancer. *Thyroid* 11, 3-14.
- [75] Scully, R.E. (1975) World Health Organization classification and nomenclature of ovarian cancer. *Natl Cancer Inst Monogr* 42, 5-7.
- [76] Scully, R.E., Sobin L. H. (1999) World Healthy Organisation (WHO). International Histological Classification of Tumours. Typing of Ovarian Tumours.
- [77] Seufert, R.S., M. Fischl, F. Pollw, K. (2005) Inhibine und Aktivine - Hormonelle Faktoren mit großer Bedeutung für die Frauenklinik. *J Fertil Reprod* 15, 12-15.
- [78] Shimizu, Y., Kamoi, S., Amada, S., Akiyama, F. and Silverberg, S.G. (1998) Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer* 82, 893-901.

- [79] Spencer SJ, R.J., Jaffe RB (1990) Human recombinant activin-A inhibits proliferation of human fetal adrenal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 71, 1678-80.
- [80] Strauss, J.F., Mastroianni, Luigi Jr., Barbieri, Robert MD (2004) Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology, 5th edition Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management, pp. 1072, Saunders.
- [81] Takumi T, M.A., Lin HY, Lodish HF. (1995) Molecular characterization of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF-beta and activin in the rat pituitary tumor cell line GH3. *Exp Cell Res* 216, 208-14.
- [82] ten Dijke P, Y.H., Ichijo H, Franzen P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH (1994) Characterization of type I receptors for transforming growth factor- beta and activin. *Science* 264, 101-4.
- [83] Toki T, F.S., Silverberg SG (1996) A clinopathological study on the association of endometriosis and carcinoma of the ovary using a scoring system. *Int J Gynaecol Cancer* 6, 68-75.
- [84] Tsuchida, K. (2004) Activins, myostatin and related TGF-beta family members as novel therapeutic targets for endocrine, metabolic and immune disorders. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4, 157-66.
- [85] Tsuchida, K., Sunada, Y., Noji, S., Murakami, T., Uezumi, A. and Nakatani, M. (2006) Inhibitors of the TGF-beta superfamily and their clinical applications. *Mini Rev Med Chem* 6, 1255-61.
- [86] Vale, W., Wiater, E., Gray, P., Harrison, C., Bilezikjian, L. and Choe, S. (2004) Activins and inhibins and their signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1038, 142-7.
- [87] Wang QF, T.K., Tilly JL, Preffer F, Schneyer AL, Crowley WF, Jr., Sluss PM (1996) Activin inhibits basal and androgen-stimulated proliferation and induces apoptosis in the human prostatic cancer cell line, LNCaP. *Endocrinol* 137, 5476-83.

-
- [88] Willis SA, Z.C., Li LI, Mathews LS (1996) Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Mol Endocrinol* 10, 367-79.
- [89] Wittekind Ch, M.H.J., Bootz F (2002) TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6.
- [90] Worbs, S., Shabani, N., Mayr, D., Gengelmaier, A., Makrigiannakis, A., Kuhn, C., Jeschke, U., Kupka, M.S., Friese, K. and Mylonas, I. (2007) Expression of the inhibin/activin subunits (-alpha, -betaA and -betaB) in normal and carcinogenic endometrial tissue: possible immunohistochemical differentiation markers. *Oncol Rep* 17, 97-104.
- [91] Yamashita, K., Yamoto, M., Shikone, T., Minami, S., Imai, M., Nishimori, K. and Nakano, R. (1997) Production of inhibin A and inhibin B in human ovarian sex cord stromal tumors. *Am J Obstet Gynecol* 177, 1450-7.
- [92] Yamashita, K., Yamoto, M., Shikone, T., Minami, S. and Nakano, R. (1999) Immunohistochemical localization of inhibin and activin subunits in human epithelial ovarian tumors. *Am J Obstet Gynecol* 180, 316-22.
- [93] Ying, S.Y. (1989) Inhibins, activins and follistatins. *J Steroid Biochem* 33, 705-13.
- [94] Ying SY, Z.Z., Furst B, Batres Y, Huang G, Li G (1997) Activins and activin receptors in cell growth. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 114-22.
- [95] Yu J, S.L., Lemas V, Yu AL, Vaughan J, Rivier J, Vale W (1987) Importance of FSHreleasing protein and inhibin in erythrodifferentiation. *Nature* 330, 765-7.
- [96] Zauberman A, O.M., Zipori D (1997) Involvement of p21(WAF1/Cip1), CDK4 and Rb in activin A mediated signaling leading to hepatoma cell growth inhibition. *Oncogene* 15, 1705-11.
- [97] Zhao, C., Bratthauer, G.L., Barner, R. and Vang, R. (2007) Comparative Analysis of Alternative and Traditional Immunohistochemical Markers for the Distinction of Ovarian Sertoli Cell Tumor From Endometrioid Tumors and Carcinoid Tumor: A Study of 160 Cases. *Am J Surg Pathol* 31, 255-266.

- [98] Zorn, B., Osredkar, J., Meden-Vrtovec, H. and Majdic, G. (2006) Leptin levels in infertile male patients are correlated with inhibin B, testosterone and SHBG but not with sperm characteristics. *Int J Androl*.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
AG	Antigen
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BMP	bone morphogenic protein
bzw.	beziehungsweise
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destillata
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
EIA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Et al.	et alteri oder et alii
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
hCG	humanes Choriongonadotropin
HRP	horseradish peroxidase
IRS	Immunreaktiver Score
kDA	Kilodalton
Lig.	Ligamentum
Lj.	Lebensjahr
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Lsg.	Lösung
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
ng	nanogramm
PBS	phosphate buffered saline
pg	picogramm
PP	Prozentsatz positiver Zellen

PD	Privatdozent
SI	Staining Intensitiy
SKR	Serin-Threonin-Kinase
sog.	sogenannt
TGF	Transforming Growth Factor
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus
WHO	World Health Organization

7.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. habil. Klaus Frieze, Direktor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt, der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Unterstützung.

Mein besonders herzlicher Dank geht an Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Udo Jeschke für die Überlassung dieses Themas und die hervorragende wissenschaftliche Unterstützung. Weiterhin möchte ich mich für die Bereitstellung der erforderlichen Mittel für die Durchführung dieser Arbeit und die Durchsicht des Textes, sowie die außerordentlich gute Betreuung während der gesamten Arbeit bedanken.

Ebenso herzlich danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. Ioannis Mylonas, für die Bereitstellung der Patientinnendaten, die Einführung in die Thematik und die zahlreichen Anregungen. Des weiteren dafür, dass er während der gesamten Arbeit stets als Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Danken möchte ich auch Frau Priv.-Doz. Dr. med. habil. Doris Mayr vom Pathologischen Institut der LMU München für die Bereitstellung der Gewebeproben und die freundschaftliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Christina Kuhn, Frau Susanne Kunze und Frau Sandra Schulze für die Unterweisung in die Methodik und die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft, sowie deren Vielzahl an Anregungen und das stets offene Ohr.

Frau cand. med. Marie-Therese Schuster danke ich herzlich für ihre liebevolle Begleitung, Kraft und Motivation und Ihrem großen Interesse an meiner Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich noch meiner Familie, die mir das Studium überhaupt erst ermöglichte, meinen allerherzlichsten Dank aussprechen. Nur mit deren wesentlicher Unterstützung und deren unendlicher Geduld konnte die vorliegende Arbeit entstehen.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtstag/-ort:	16. Februar 1974, Amberg
Wohnort:	82211 Herrsching, Rieder Straße 14
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schule und Studium

11/2007	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - Staatsexamen
03/2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - Ärztliche Vorprüfung
2000 – 2007	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1997 – 1999	Städtische Berufsoberschule Fachrichtung Wirtschaft in München Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1990 – 1992	Realschule in Herrsching Abschluss: Mittlere Reife
1985 – 1990	Christoph-Probst-Gymnasium in Gilching
1980 – 1985	Grund- und Hauptschule in Herrsching

Praktisches Jahr

06/06 – 10/06	Chirurgie; Klinikum Starnberg , Lehrkrankenhaus der LMU München, Klinik für Chirurgie
10/06 – 01/07	Anästhesie; Universitätsklinikum Großhadern München, Klinik für Anaesthesiologie
02/07 – 06/07	Innere; Klinikum Landshut gGmbH , Lehrkrankenhaus der LMU München, Klinik für Innere Medizin/Kardiologie

Berufsausbildung

2000	Ausbildung als Rettungssanitäter bei RDSA in Augsburg
1992 – 1995	Ausbildung als Werbekaufmann bei vwi Werbung GmbH in Herrsching

Famulaturen

08/05 - 09/05	Innere Medizin, Klinikum Starnberg , Notaufnahme, Intensiv-/Privatstation
03/05 - 05/05	Innere Medizin, Klinikum Starnberg , Notaufnahme, Intensiv-/Privatstation
08/04 - 09/04	Chirurgie, Chirurgische Klinik , Seefeld, OP/Ambulanz

09/03 - 10/03

Innere Medizin, Privatklinik Dr. Robert Schindlbeck,
Herrsching Intensivstation**Berufs-/Nebentätigkeit**

seit 01.04.08	Assistenzarzt , Privatklinik Dr. R. Schindlbeck, Herrsching
01.01.08 - 31.03.08	Assistenzarzt , Klinikum Kaufbeuren, Kardiologie
2005 - 2007	Tätigkeit als studentische Hilfskraft in der interdisziplinären Notaufnahme des Klinikums Starnberg
2000 - 2007	Tätigkeit als hauptamtlicher Rettungssanitäter beim BRK Starnberg
seit 2000	Dozent an der Rettungsdienstschule München (RDSM)
11/1999 - 03/2000	Computerabteilung bei Fa. 3M ESPE GmbH in Seefeld
09/1999 - 10/1999	Pflegepraktikum bei Privatklinik Dr. Schindlbeck in Herrsching/Intensivstation
05/1997 - 07/1997	Praktikant bei Starnberger Merkur in Starnberg
02/1997 - 04/1997	Juniorkontakter bei school Werbung in Seefeld
1996 - 1997	Wehrdienst Bundeswehr (Feldjägersdienst Murnau)
1995 - 1996	Juniorkontakter bei vwi Werbung GmbH in Herrsching

Weiteres/Engagement

15 Jahre lang Mitglied bei der BRK Wasserwacht, Mitglied der Vorstandschaft, Bootsführer und Schnelleinsatzgruppe Unterstützung der Teddyärzte e.V.

Zusatzqualifikationen

Fremdsprachen	Englisch in Wort und Schrift Spanisch Grundkenntnisse Norwegisch Grundkenntnisse
EDV:	MS Office (Windows), Statistik- und Analysesoftware (SPSS), Literaturverwaltungsprogramm (Endnote)

Hobbys

Bergwandern, Inlineskaten, Karate, Lesen, Mountainbiken, Sportstudio